

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SANDRA JEREMIAS DOS SANTOS CATARINO

POLIMORFISMOS DO GENE *MASP2*
E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DA PROTEÍNA MASP-2
NA FEBRE REUMÁTICA E CARDIOPATIA REUMÁTICA
CRÔNICA

Curitiba

2014

SANDRA JEREMIAS DOS SANTOS CATARINO

POLIMORFISMOS DO GENE *MASP2*
E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DA PROTEÍNA MASP-2
NA FEBRE REUMÁTICA E CARDIOPATIA REUMÁTICA
CRÔNICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna e Ciências da saúde, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Linha de Pesquisa de Associação Genética a Doenças, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iara José de Messias Reason
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Angelica B. Winter Boldt

Curitiba

2014

Catarino, Sandra Jeremias dos Santos
Polimorfismos do gene MASP2 e concentrações séricas da proteína
MASP-2 na febre
reumática e cardiopatia reumática crônica / Sandra Jeremias dos Santos
Catarino. –

Curitiba, 2014.
99 f.; tab.; il.; gráf.; color.; 30 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara José de Messias Reason
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Angelica B. Winter Boldt

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina
Interna. Setor
de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Febre Reumática. 2. Cardiopatia Reumática. 3. Serina Proteases.
I. Reason, Iara José de Messias. II. Título.

NLM QH 455



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA - MESTRADO E DOUTORADO



DECLARAÇÃO

Declaro, para fins curriculares que **Sandra Jeremias dos Santos Catarino**, apresentou e defendeu, com aprovação pela Banca Examinadora a Dissertação intitulada: **"POLIFORMISMOS DO GENE MASP2 E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DA PROTEÍNA MASP-2 NA FEBRE REUMÁTICA E CARDIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA"**, do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, nível Mestrado** desta Universidade. Nesta ocasião, foi recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de *Mestre em Medicina Interna*, com a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 23 de maio de 2.014.

Professor Dr. Hélio Afonso Ghizoni Teive
Coordenador do Programa

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Iara, minha orientadora e amiga, que sempre acreditou em mim e me incentivou em todos os momentos.

À querida coorientadora, Prof. Dra. Angelica, que me ajudou em tudo, sempre sendo solícita e paciente comigo.

Ao colega Dr. Renato, pelas orientações e experiência transmitida.

À amiga Dra. Marcia, pela generosa contribuição sempre esclarecendo as minhas inúmeras dúvidas.

A todas as colegas de laboratório que compartilharam tantos momentos especiais.

À minha mãe Cleide pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu namorado Vinicius pela paciência e consideração.

Ao meu gato Bob pelo companheirismo irrestrito e em tempo integral.

E principalmente agradeço a Deus por mais essa benção em minha vida.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

MASP-2, a serina protease 2 associada à lectina ligante de manose ou ficolinas, é uma proteína-chave na ativação da via das lectinas do complemento. Diversos polimorfismos do gene *MASP2* estão associados com concentrações séricas ou grau de atividade funcional de MASP-2. Neste trabalho, investigamos uma possível associação entre polimorfismos de *MASP2* e concentrações séricas de MASP-2 com a suscetibilidade à febre reumática (FR) e a cardiopatia reumática crônica (CRC). Foram haplotipados 11 polimorfismos de *MASP2* utilizando PCR multiplex sequência-específica em 145 pacientes com história de FR provenientes do sul do Brasil (103 com CRC e 42 sem acometimento cardíaco [FRo]) e 290 controles saudáveis. As concentrações de MASP-2 foram determinadas por ensaio de imunoadsorção enzimática em 145 pacientes e 145 controles. Os polimorfismos p.377A e p.439H, associados à baixa produção de MASP-2, foram negativamente associados à CRC ($p=0,02$, $OR=0,25$). Em contraste, haplótipos com quatro polimorfismos, localizados do intron 9 ao exon 12 (*CDVR*) e associados a concentrações intermediárias de MASP-2, aumentaram a suscetibilidade a CRC ($p=0,02$, $OR=4,9$). Apesar disso, as concentrações de MASP-2 foram mais baixas nos pacientes, do que nos controles, provavelmente devido ao consumo da proteína pela ativação da via das lectinas (medianas 253 vs. 321 ng/ml respectivamente, $p<0,0001$). Logo, polimorfismos de *MASP2* associados à concentração sérica de MASP-2 podem atuar como moduladores no desenvolvimento da FR. A elucidação do papel desempenhado por MASP-2 na suscetibilidade a FR poderá auxiliar no desenho de estratégias de prevenção e tratamento da doença.

Palavras-chave: Febre reumática; cardiopatia reumática crônica; MASP-2; polimorfismos de *MASP2*

ABSTRACT

MASP-2, the serine protease 2 associated with mannose-binding lectin or ficolins, is a key protein in the activation of the lectin pathway of complement. Several *MASP2* gene polymorphisms have been associated with serum levels or degree of functional activity of MASP-2. In this work, we investigated a possible association between *MASP2* polymorphisms and MASP-2 serum levels with the susceptibility to Rheumatic Fever (RF) and Rheumatic Heart Disease (RHD). We haplotyped 11 *MASP2* polymorphisms with multiplex sequence-specific PCR in 145 patients with history of RF from south Brazil (103 with RHD and 42 without cardiac lesion [RFo]) and 290 healthy controls. MASP-2 levels were determined by enzyme-linked immunoadsorbance assay in 145 patients and 145 controls. The p.377A and p.439H polymorphisms, associated with low MASP-2 production, were negatively associated with RHD ($p=0.02$, $OR=0.25$). In contrast, haplotypes comprising four polymorphisms, located from intron 9 to exon 12 (*CDVR*) and associated with intermediate MASP-2 concentrations, increased the susceptibility to RHD ($p=0.02$, $OR=4.9$). Nevertheless, MASP-2 levels were lower in patients than in controls, probably due to protein consumption by the activation of the lectin pathway (medians 253 vs. 321 ng/ml, $p<0.0001$). Thus, *MASP2* polymorphisms associated MASP-2 production may act as immune modulators in the development of RF. The elucidation of the role of MASP-2 in RF susceptibility might help in the design of strategies for RF prevention and treatment.

Keywords: Rheumatic fever; rheumatic heart disease; MASP-2; *MASP2* polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS:

FIGURA 1 - PREVALÊNCIA DA FEBRE REUMÁTICA NO MUNDO.....	18
FIGURA 2 - FISIOPATOLOGIA DA FR BASEADA NA HIPÓTESE DO MIMETISMO MOLECULAR.....	22
FIGURA 3 - PATOGÊNESE DA FR de acordo com Tandon et al. 2013.....	23
FIGURA 4 - FARINGITE ESTREPTOCÓCICA E NÃO ESTREPTO- CÓCICA	24
FIGURA 5 - ORDEM DO ACOMETIMENTO VALVAR NA CARDITE REUMÁTICA	28
FIGURA 6 - PAPEL INTEGRADOR DO COMPLEMENTO NA DEFESA DO HOSPEDEIRO E HOMEOSTASE	33
FIGURA 7 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO	34
FIGURA 8 - ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS DO COMPLEMENTO.....	36
FIGURA 9 - ETAPAS FINAIS DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.....	37
FIGURA 10 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS.....	45
FIGURA 11 – NOMENCLATURA FILOGENÉTICA DOS HAPLÓTIPOS DO GENE <i>MASP2</i>	46
FIGURA 12 - GENE <i>MASP2</i> E OS SNPs PESQUISADOS.....	56
FIGURA 13 – FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR-SSP E SUA RELAÇÃO COM O GENE E A PROTEÍNA MASP-2.....	58
FIGURA 14 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS PCRs REALIZADAS PARA O GENE <i>MASP2</i>	62

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 EM PACIENTES E CONTROLES	71
GRÁFICO 2 - CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 ASSOCIADAS COM POLIMORFISMOS rs2273344 e rs9430347 QUE FLANQUEAM O EXON 5 ALTERNATIVO	72
GRÁFICO 3 - CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 ASSOCIADAS COM HAPLÓTIPOS ALTO (h), MÉDIO (i) E BAIXO (l) PRODUTORES	73
GRÁFICO 4 – DIFERENÇAS ENTRE CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 EM INDIVÍDUOS COM MESMO GENÓTIPO.....	74
GRÁFICO 5 - CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 EM TODOS OS GRUPOS ANALISADOS	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CRITÉRIOS MODIFICADOS DE JONES NO DIAGNÓSTICO DA FR.....	25
TABELA 2 – PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CASCATA DO COMPLEMENTO	38
TABELA 3 - REGULADORES DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.....	40
TABELA 4 - DEFICIÊNCIAS DO COMPLEMENTO GENETICAMENTE DETERMINADAS E ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS	42
TABELA 5 – INICIADORES SSP UTILIZADOS	57
TABELA 6 – CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO.....	60
TABELA 7 – INTERPRETAÇÃO DAS AMOSTRAS DA FIGURA 14	62
TABELA 8 – CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES CRC E FRo.....	65
TABELA 9 – FREQUÊNCIAS (%) DOS ALELOS MENOS COMUNS DE <i>MASP2</i>	67
TABELA 10 – FREQUÊNCIAS (%) DOS HAPLÓTIPOS DE <i>MASP2</i>	69
TABELA 11 – CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 EM PACIENTES E CONTROLES	70
TABELA 12 – ASSOCIAÇÕES ENCONTRADAS ENTRE MASP-2 E A FEBRE REUMÁTICA	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

Ac	anticorpo
aHUS	síndrome urêmica hemolítica atípica
APC	célula apresentadora de antígeno
ASLO	anticorpos anti-estreptolisina O
CCPR	proteínas repetidas de controle do complemento
CD	diferenciação de agrupamento
CFHR	proteína relacionada ao fator H do complemento
CR	receptor de complemento
CR1	receptor 1 do complemento
CRC	cardiopatia reumática crônica
CRP	proteína C reativa
CUB	acrônimo para um domínio originalmente descrito em subcomponentes do complemento C1r/C1s, Uegf e proteína óssea morfogênica
D	asparagina
DAF	fator de aceleração de decaimento
DAMP	padrões moleculares associados a danos
DIC	coagulação intravascular disseminada
DNA	ácido desoxirribonucleico
DR	doença reumática
EGA	estreptococo do grupo A
EGF	fator de crescimento epidérmico
ELISA	ensaio de imunoadsorção enzimática
FCN	ficolina
FcγR	receptor da porção Fc
FR	febre reumática
FRo	pacientes FR sem acometimento cardíaco
G	glicina
GNDA	glomerulonefrite difusa aguda
GPI	glicofosfatidilinositol
GRAB	proteína ligante alfa2-macroglobulina G-relacionada
HLA	antígeno leucocitário humano
HSPC	hiperplasia da suprarrenal congênita
IgG	imunoglobulina G

LES	lúpus eritematoso sistêmico
MAC	complexo de ataque a membrana
MASP	serina protease associada à MBL
MBL	lectina ligante de manose
MCP	proteína cofatora de membrana
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
Mφ	macrófago
mRNA	RNA mensageiro
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos
PARF	peptídeo associado a FR
PCR	reação em cadeia da polimerase
PMNs	polimorfonucleares
PR	intervalo entre o início da onda P e início do complexo QRS
RCA	reguladores da atividade do complemento
SNPs	polimorfismos de nucleotídeos únicos
SSP	primer sequência-específico
STAT3	ativador 3 de transcrição e transdução de sinal
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCC	complexo terminal do complemento
TCR	receptor da célula T
T _H	T auxiliar
TLR	receptor tipo Toll

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 HIPÓTESE	16
3 OBJETIVOS	16
3.1 GERAL	16
3.2 ESPECÍFICOS	16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4.1 FEBRE REUMÁTICA	17
4.1.1 Epidemiologia da FR	17
4.1.2 Etiopatogenia da FR	19
4.1.3 Diagnóstico da faringite estreptocócica.....	23
4.1.4 Diagnóstico e manifestações clínicas da FR	25
4.1.5 Cardite e cardiopatia reumática crônica	27
4.1.6 Tratamento da FR	29
4.1.7 Vacina	30
4.2 SISTEMA COMPLEMENTO	31
4.2.1 Regulação da ativação do complemento	39
4.2.2 Deficiências de complemento	40
4.2.3 MASP-2.....	43
4.2.4 Polimorfismos de <i>MASP2</i> e associação com doenças	47
4.3 COMPLEMENTO E FEBRE REUMÁTICA.....	48
4.4 VIA DAS LECTINAS E FEBRE REUMÁTICA	49
5 MATERIAIS E MÉTODOS	52
5.1 CASUÍSTICA.....	52
5.1.1 Pacientes	52
5.1.2 Controles.....	53
5.2 MÉTODOS	53
5.2.1 Extração de DNA	53
5.2.2 Reação em cadeia da polimerase sequência específica (PCR-SSP)	54
5.2.3 PCR-SSP do gene <i>MASP2</i>	55
5.2.4 Quantificação de MASP-2	63
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64

6 RESULTADOS	65
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES	65
6.2 POLIMORFISMOS DE <i>MASP2</i>	66
6.3 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE <i>MASP-2</i>	70
7 DISCUSSÃO	76
8 CONCLUSÕES	82
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXO	99

1 INTRODUÇÃO

A febre reumática (FR) é uma doença inflamatória de caráter autoimune decorrente da reação imunológica anormal contra antígenos do *Estreptoco β-hemolítico* do grupo A (EGA) de Lancefield. A FR ocorre como uma complicação tardia, após infecção de orofaringe por cepas reumatogênicas do EGA, em indivíduos geneticamente predispostos. A doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo cardite, artrite, coreia de Sydenham, nódulos subcutâneos e eritema marginado. A cardite é a manifestação mais grave, podendo ocorrer algumas semanas após a infecção, em 30-45% dos pacientes com FR (BARBOSA et al., 2009; GUILHERME; RAMASAWMY; KALIL, 2007; RAMASAWMY et al., 2008).

A cardiopatia reumática crônica (CRC) é a causa mais comum de doença valvular adquirida em crianças e adultos jovens em todo o mundo permanecendo como um sério problema de saúde pública nos países em desenvolvimento (BARASH, 2013). Embora a incidência da FR e da CRC tenha diminuído significativamente em regiões do mundo onde existe acesso aos antibióticos, ainda há uma alta incidência da doença nos países em desenvolvimento (CHANG, 2011).

Os polimorfismos gênicos que mais contribuem para a susceptibilidade à FR e CRC são os alelos do complexo principal de histocompatibilidade ou Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) de classe II, especialmente o HLA-DR7 (GUILHERME; KALIL, 2010). Outros alelos de susceptibilidade foram descritos em genes que codificam proteínas do sistema complemento, tais como *MBL*, *FCN2* e *MASP2* (MESSIAS REASON et al., 2006; MESSIAS-REASON et al., 2009; RAMASAWMY et al., 2008; SCHAFRANSKI et al., 2004, 2008a, 2008b). O sistema complemento compreende um conjunto de mais de 40 proteínas séricas e de membrana que estão envolvidas em diversos processos da resposta imune, incluindo: fagocitose e destruição de patógenos, eliminação de complexos imunes e células apoptóticas, liberação de mediadores inflamatórios e regeneração de tecidos (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011; STÄGER et al., 2003). O processo de ativação do complemento ocorre através de três vias: clássica, alternativa e das lectinas. A via das lectinas engloba as serina-proteases associadas à MBL (MASP-1, MASP-2 e MASP-3), a MBL (lectina ligante de manose) e as ficolinas. MASP-2 é crucial para a

ativação do complemento pela via das lectinas. Polimorfismos presentes no gene *MASP2* estão associados com baixas concentrações plasmáticas e atividade funcional da proteína (THIEL et al., 2007, 2009). Crescentes evidências tem demonstrado que a deficiência ou super-expressão de MBL e MASP-2, as quais são geneticamente determinadas, estão associadas com a susceptibilidade a infecções e doenças autoimunes (TURNER, 2003; SØRENSEN et al., 2005; BOLDT et al., 2012). Fato que reflete a importância da via das lectinas na eliminação de patógenos e corpos apoptóticos, potenciais desencadeadores de resposta autoimune (BOLDT et al., 2012). Além disso, o aumento da concentração de componentes da via das lectinas pode induzir lesões por ativação exacerbada do sistema complemento, aumentando o risco de dano tecidual (BOUWMAN; ROEP; ROOS, 2006).

A proteína MASP-2 parece apresentar função importante na proteção contra a infecção pelo *Streptococcus pyogenes*, assim como na resposta inflamatória da FR. Por sua vez, polimorfismos do gene *MASP2* podem provocar alteração da expressão gênica interferindo nos níveis séricos de MASP-2, afetando a eficiência da resposta imune contra este microrganismo (SCHAFRANSKI et al., 2008). Considerando que polimorfismos apresentam efeito aditivo, estes devem ser investigados como haplótipos. Como MASP-2 é uma proteína chave na ativação da via das lectinas, é provável que haplótipos e genótipos de *MASP2* possam estar associados à susceptibilidade da FR e/ou CRC, justificando o presente estudo.

2 HIPÓTESE

A via das lectinas é ativada pelo EGA e sua ativação pode ter caráter pró-inflamatório, portanto polimorfismos de *MASP2* e concentrações séricas de MASP-2 modulam a suscetibilidade a FR e a CRC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se existe associação entre genótipos e haplótipos dos polimorfismos de *MASP2*, bem como entre as concentrações séricas da proteína codificada por este gene, com a susceptibilidade à FR e à CRC em pacientes do sul do Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) rs7548659, rs61735600, rs72550870, rs56392418, rs2273344, rs9430347, rs17409276, rs12711521, rs2273346, rs12085877, rs1782455 de *MASP2* em pacientes com FR e controles.
- Verificar se existe associação entre os genótipos de *MASP2* com as concentrações séricas da proteína em pacientes e controles.
- Investigar se existe associação entre os haplótipos compostos de todos os SNPs investigados e genótipos de *MASP2* com a suscetibilidade à FR e CRC.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 FEBRE REUMÁTICA

A FR é uma doença inflamatória decorrente de infecção da orofaringe por *Streptococcus beta-hemolítico* do grupo A de Lancefield (EGA). A doença manifesta-se geralmente 2 a 3 semanas após a infecção e o processo inflamatório envolve múltiplos órgãos incluindo coração, articulações, pele e sistema nervoso central (BURKE; CHANG, 2014). O primeiro surto agudo de FR ocorre com maior frequência em crianças entre 5 e 14 anos, sendo incomum em menores de 4 anos, provavelmente devido a imaturidade do sistema imunológico com menor produção de anticorpos, e em indivíduos adultos pela menor ocorrência de infecções estreptocócicas. É mais comum no inverno e durante a primavera. Tem maior incidência em países em desenvolvimento, possivelmente devido às aglomerações humanas, dificuldade de acesso à saúde pública, frequência elevada de automedicação, creches com má qualidade de higiene e ventilação (BARBOSA et al., 2009; CHANG, 2011).

4.1.1 Epidemiologia da FR

A incidência da FR varia globalmente e está constantemente mudando (Figura 1). Antes da década de 40, quando os antibióticos foram descobertos, as doenças causadas pelo EGA eram uma das principais causas de morbidade e mortalidade, em todas as partes do mundo. Atualmente as maiores taxas da doença (95%) ocorrem em países em desenvolvimento, incluindo Índia, outras partes da Ásia, do Mediterrâneo e Oriente Médio, ilhas do Pacífico, Austrália, América Latina e Caribe (CHANG, 2011). Contudo, há relatos de surtos em países desenvolvidos, como EUA e Europa, possivelmente devido ao reaparecimento de certos sorotipos reumatogênicos (BREDA et al., 2013; PASTORE et al., 2011; VEASY et al., 1987). As razões para as flutuações na incidência da doença ainda não estão totalmente compreendidas e, embora a FR esteja sendo estudada extensivamente, a sua patogênese ainda não está completamente esclarecida (GUILHERME et al., 2005).

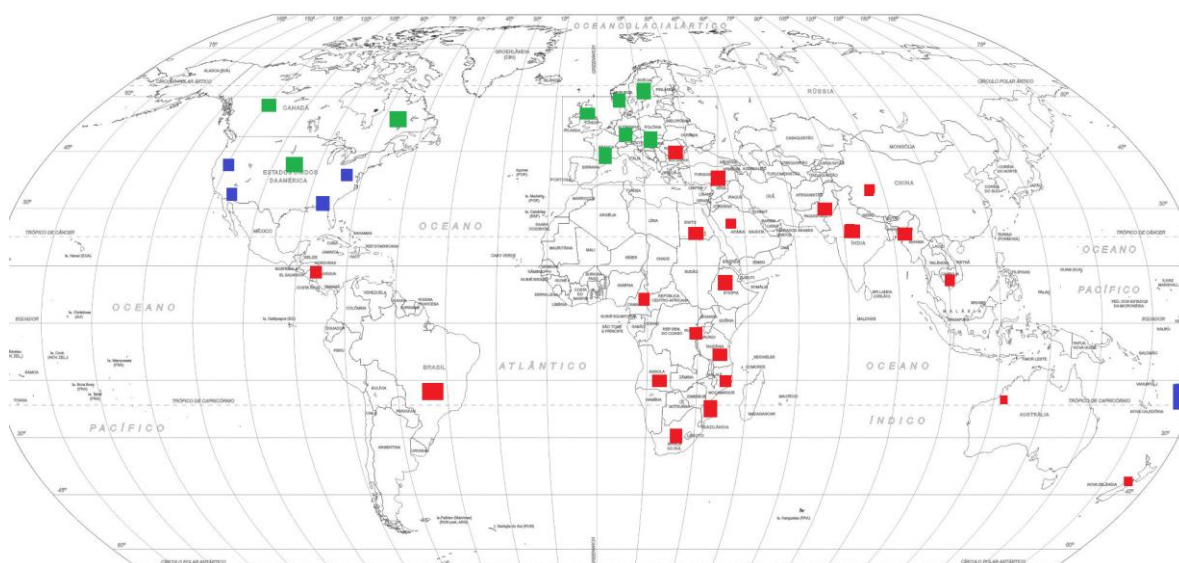


FIGURA 1: PREVALÊNCIA DA FEBRE REUMÁTICA NO MUNDO

NOTA: Quadrados vermelhos: regiões com atual elevada prevalência de FR. Quadrados verdes: regiões que experimentaram declínio significativo da FR ao longo das últimas décadas. Quadrados azuis: áreas nas quais se observou um ressurgimento da FR. FONTE: Chang, 2011 modificado.

A incidência mundial anual de FR aguda é de 5 – 51 por 100.000 indivíduos, sendo menor na América do Norte e Europa e mais alta em países em desenvolvimento como Índia e Brasil (WOLFE, 2000; CARAPETIS et al., 2005). Embora esses valores sejam altos, provavelmente não refletem a real situação das crianças infectadas na maior parte dos países em desenvolvimento (GUILHERME; KALIL, 2010). TORRES observou a presença do EGA na orofaringe de 76,9% de 1768 crianças de 16 abrigos na cidade de Curitiba/PR, sendo que a maioria delas apresentava sintomas de infecção de vias aéreas superiores, no momento da coleta (TORRES, 2000). Em países subdesenvolvidos, a CRC, principal manifestação clínica da FR, tem uma taxa de incidência de 18,6/1000, o que a torna uma das principais causas de mortalidade cardiovascular entre crianças em idade escolar. Nos países em desenvolvimento, a incidência real de CRC sugerida pela vigilância baseada na comunidade pode ser até de 500/100.000 indivíduos (CARAPETIS et al., 2005; CHANG, 2011; MAURICE, 2013; TIBAZARWA; JA; MAYOSI, 2008). KUMAR e TANDON sugerem que existam, atualmente, cerca de 2,0 a 2,5 milhões de pacientes com CRC na Índia (KUMAR; TANDON, 2013). Um estudo na Índia envolvendo 6270 crianças submetidas à triagem ecocardiográfica confirmou que a

CRC subclínica está presente em cerca de 20/1000 crianças (SAXENA et al., 2011). Há estimativas conservadoras de cerca de 15 a 20 milhões de pessoas acometidas pela CRC em todo o mundo e 470.000 casos novos da doença anualmente, bem como 233.000 mortes. Cerca de 2 milhões de casos necessitam de repetidas hospitalizações e um milhão de casos pode necessitar de transplante cardíaco em 5 a 20 anos (CARAPETIS et al., 2005; CHANG, 2011; MAURICE, 2013; TIBAZARWA; JA; MAYOSI, 2008).

No Brasil, estima-se que ocorram, a cada ano, dez milhões de infecções de orofaringe por EGA, sendo que cerca de 30.000 delas provocam FR aguda (0,3% do total) e aproximadamente 15.000 deixam sequelas de CRC (BARBOSA et al., 2009).

4.1.2 Etiopatogenia da FR

O *Streptococcus pyogenes* é uma bactéria Gram-positiva com uma cápsula hialurônica e diversas proteínas extramembranas. A classificação do estreptococo é feita pela tipagem do carboidrato de que é composta sua camada média e central, de A a O. Apenas o estreptococo do grupo A (EGA) é capaz de produzir a FR. Apesar de outros grupos sorológicos de estreptococos beta-hemolíticos (por exemplo, B, C, G, e F) estarem associados a infecções de vias aéreas superiores, nenhum deles pode causar FR. Apenas os grupos A e G são capazes de produzir a proteína M em sua camada externa. Esta proteína é o principal antígeno bacteriano relacionado à patogênese da FR, já que confere resistência à fagocitose, aumentando a virulência do patógeno. A proteína M compartilha homologia estrutural com proteínas α -helicoidais humanas como a miosina cardíaca, tropomiosina, queratina, laminina, vimentina e diversas outras proteínas (GUILHERME; KO, 2011). A sorotipagem do estreptococo, desenvolvida por Lancefield em 1928, é baseada na proteína M, que é codificada pelo gene *emm*. Existem 83 sorotipos M e muitos dos isolados são sorotipos não-M. Atualmente, a tipagem *emm* é feita por método de sequenciamento baseado em PCR, que identifica a região terminal variável N da proteína M. Atualmente, mais de 200 tipos *emm* foram descritos (SHAH et al., 2013).

FR e CRC ocorrem em 1 a 5% das crianças que tiveram infecção de orofaringe prévia por EGA e não foram tratadas (CHANG, 2011). Esta susceptibilidade está relacionada a fatores genéticos e imunológicos, como marcadores de linfócitos B e antígenos HLA de classe II, principalmente HLA-DR7 e DR53. Produtos destes alelos HLA facilitam a apresentação de alguns peptídeos estreptocócicos que, mais tarde, desencadearão reações autoimunes (GUILHERME et al., 2011). A associação observada para o alelo *TNFA1* do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), cujo gene está situado próximo aos genes HLA, pode ser devida ao desequilíbrio de ligação com esses alelos e/ou devido à exacerbação da resposta inflamatória (GUILHERME et al., 2011).

Estudos tem demonstrado que linfócitos T CD4+ são os principais agentes das reações autoimunes no tecido cardíaco de pacientes com CRC. A ativação das células T CD4+ é desencadeada pela apresentação por moléculas HLA de classe II de antígenos do EGA, que exibem similaridades estruturais ou de sequência para epítomos próprios, ativando linfócitos T auto-reativos, mecanismo conhecido como mimetismo molecular. As células T auto-reativas ativam células B que produzirão anticorpos autoreativos (GUILHERME et al., 1991; RAIZADA et al., 1983).

Mimetismo entre antígenos estreptocócicos, principalmente epítomos da proteína M, e componentes cardíacos tem sido proposto como o principal fator desencadeador para a autoimunidade em indivíduos com predisposição genética para FR (GUILHERME; KALIL, 2002). Três tipos de mimetismo mediado por anticorpos contra *S. pyogenes* tem sido descritos incluindo o compartilhamento de (1) sequências idênticas de aminoácidos, (2) sequências homólogas, mas não idênticas e (3) epítomos de moléculas diferentes, como carboidratos, DNA e gangliosídeos (CUNNINGHAM, 2000). Já o mimetismo molecular para os linfócitos T é mediado por um mecanismo diferente. O reconhecimento da bactéria e/ou antígenos próprios depende da apresentação do antígeno por células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, por moléculas HLA de classe I ou II para as células T. O reconhecimento de proteínas próprias por outras células é mediado pelo mecanismo de “epítomos espalhados”, no qual uma resposta imune inicial contra um determinado patógeno gera uma grande diversidade de reconhecimento de auto-antígenos que

desencadeia uma amplificação e diversificação da resposta imune (CUNNINGHAM, 2000; GUILHERME; KALIL; CUNNINGHAM, 2006). Entre as proteínas humanas, a miosina e a vimentina parecem ser as que têm maior reatividade cruzada com a proteína M. Anticorpos auto-reativos ligam-se à superfície endotelial, levando à inflamação, infiltração celular e cicatrização ou fibrose da válvula cardíaca, sendo este processo facilitado pelas moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) (Figura 2) (GUILHERME; KALIL, 2010; GUILHERME et al., 2005).

Recentemente, autoanticorpos específicos para autoantígenos do endotélio com reatividade cruzada com proteínas estreptocócicas foram descritos na CRC. Sendo que anticorpos anti-vimentina foram observados em 49% dos pacientes. Anticorpos com reatividade cruzada vimentina-estreptocócico causaram dano ao endotélio cardíaco microvascular, por amplificação da resposta inflamatória na CRC (DELUNARDO et al., 2013).

Embora o mecanismo de mimetismo molecular seja considerado importante no desencadeamento das reações autoimunes na FR e CRC (GUILHERME et al., 2011), recentemente, outras hipóteses têm sido discutidas (KAMBLOCK et al., 2003; KINSLEY; GIRDWOOD; MILNER, 1981; KUMAR; TANDON, 2013; ORAN et al., 2001; SAIKIA et al., 2012; TANDON, 2012; VASAN et al., 1996). KUMAR et al. afirmaram que a insuficiência cardíaca congestiva na FR é devida a uma sobrecarga de volume agudo de regurgitação mitral e/ou aórtica, mas não devido a miocardite *per se* (KUMAR; TANDON, 2013). TANDON *et al.* afirmaram que a hipótese do mimetismo molecular não pode explicar adequadamente muitos aspectos da doença, tais como o envolvimento multissistêmico, a preservação do miocárdio e os efeitos específicos no tecido cardíaco valvular; desta forma propondo uma hipótese alternativa onde a proteína M do estreptococo liga-se ao colágeno tipo IV e induz autoimunidade. Embora a inflamação endotelial e no colágeno possam recuperar-se completamente, nas válvulas cardíacas ocorre a cicatrização, com dano permanente da mesma (Figura 3) (TANDON et al., 2013).

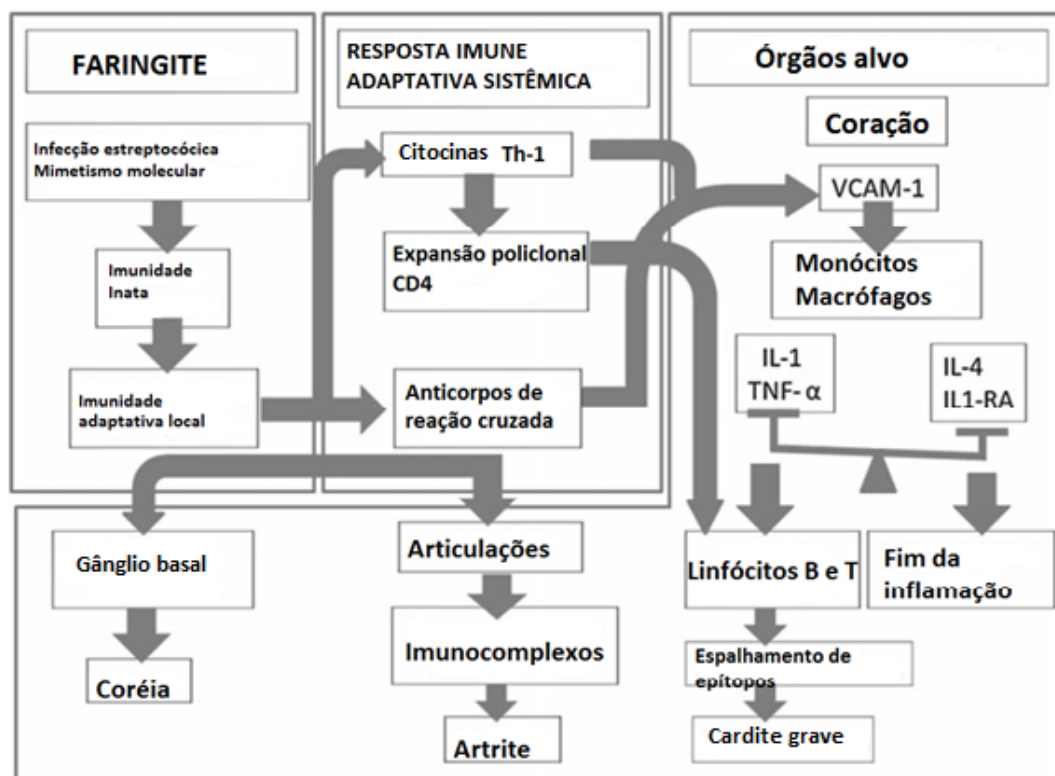


FIGURA 2: FISIOPATOLOGIA DA FR BASEADA NA HIPÓTESE DO MIMETISMO MOLECULAR.

NOTA: Infecção de faringe por *S. pyogenes* possuindo epítomos similares a estruturas humanas (mimetismo molecular) é inicialmente combatida pela imunidade inata que desencadeia a imunidade adaptativa local, que produzirá quantidades exacerbadas de citocinas pró-inflamatórias e anticorpos, alguns deles capazes de reconhecimento cruzado de epítomos humanos e bacterianos. As citocinas agem sistemicamente, ativando e expandindo múltiplos clones de linfócitos. A nível de articulações, os anticorpos precipitam na forma de imunocomplexos e ativam o complemento levando a artrite. Alguns anticorpos reconhecem os neurônios da gânglia basal e induzem a secreção de dopamina levando a Coreia de Sydenham e provavelmente a desordem obsessivo compulsiva em alguns pacientes. Autoanticorpos contra estruturas do coração, principalmente miosina, laminina e tropomiosina, promovem expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, inicialmente recrutando monócitos e macrófagos. Estas células mononucleares produzem uma gama de citocinas que agem localmente com propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. O equilíbrio entre estas citocinas pode ser influenciado pela genética do hospedeiro e determinará se os linfócitos periféricos serão atraídos para o coração, onde o fenômeno de espalhamento de epítomos pode ocorrer, levando a uma inflamação intensa e persistente e danos ao coração. LEGENDA: VCAM-1: molécula de adesão celular vascular 1; IL-1: Interleucina 1; TNF- α : Fator de necrose tumoral α ; IL-4: Interleucina 4; IL1-RA:receptor antagonista de interleucina 1.

FONTE: GUILHERME *et al.*, 2012.

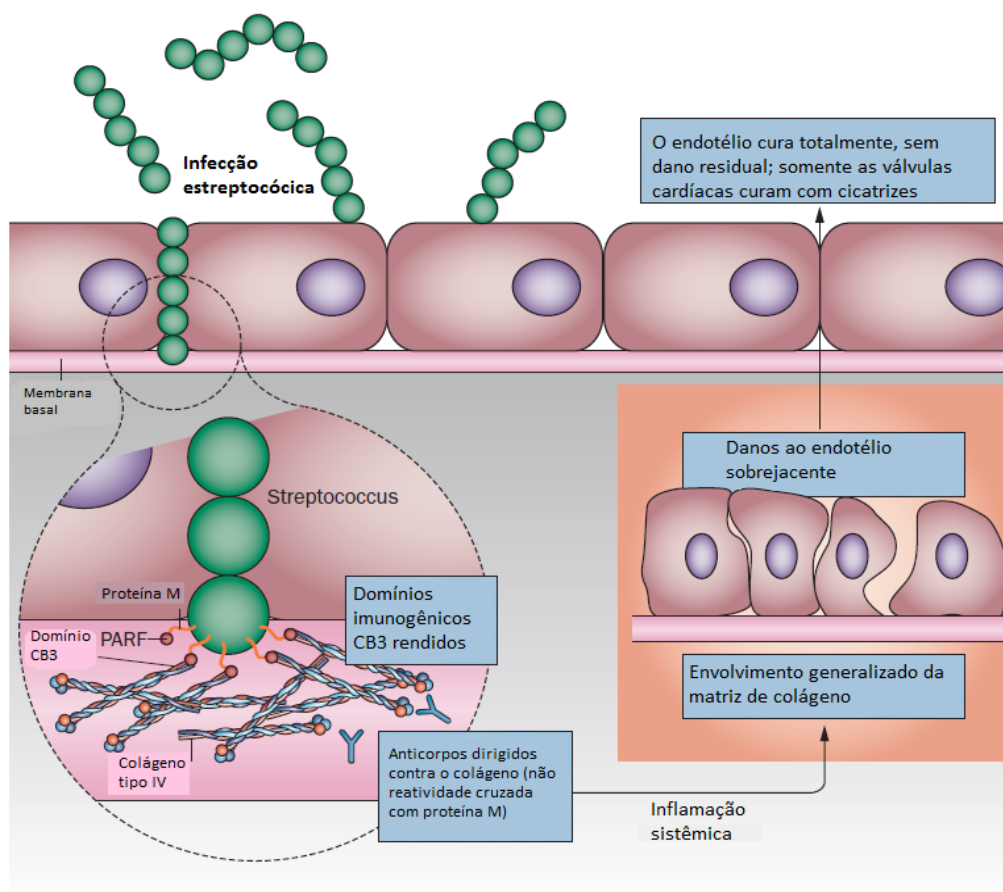


FIGURA 3: PATOGÊNESE DA FEBRE REUMÁTICA de acordo com Tandon et al 2013

NOTA: Durante a febre reumática aguda, a matriz de colágeno e a camada de células endoteliais que a sobrepõe são afetadas por todo o corpo. Devido à cobertura endotelial bilateral das válvulas cardíacas com tecido intermediário mínimo, a cura com formação de cicatriz conduz a danos permanentes; outros órgãos curam sem danos residuais. LEGENDA: PARF - peptídeo associado com FR.

FONTE: TANDON *et al.*, 2013.

4.1.3 Diagnóstico da faringite estreptocócica

A faringite aguda é mais frequentemente causada por vírus em todas as faixas etárias, sendo o diagnóstico diferencial difícil, pois nenhum dos achados clínicos é específico para a faringite estreptocócica (SHAH et al., 2013). O *S. pyogenes* é a bactéria que mais comumente causa faringite aguda, responsável por 5 a 15% das infecções em adultos e 20 a 30%, em crianças. O diagnóstico preciso da faringite estreptocócica seguido por terapia antimicrobiana é importante para a

prevenção da FR aguda e de complicações supurativas (abscesso peritonsilar, linfadenite cervical, mastoidite e outras infecções invasivas). Além disso, melhora sinais e sintomas clínicos, levando ao rápido declínio da fase contagiosa e permitindo retomada das atividades normais (SHULMAN et al., 2012).

Os achados clínicos sugestivos de faringite estreptocócica em crianças com idade entre 5-15 anos são: aparecimento súbito de dor de garganta, dor ao deglutir, febre $> 38^{\circ}\text{C}$ e cefaléia; também podem ocorrer dor abdominal, náuseas e vômitos. Outros achados clínicos podem estar presentes incluindo edema, hiperemia, úvula vermelha, entre outros (Figura 4) (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000; KASPER; FANCI; BRAUNWALD, 2002; SHULMAN et al., 2012).

Dada à dificuldade de realizar o diagnóstico da infecção estreptocócica com bases clínicas, este deve ser estabelecido por meio de métodos de detecção rápida de antígenos estreptocócicos e/ou por cultura de orofaringe (obtidas por swab). A cultura de orofaringe apresenta sensibilidade entre 90% a 95%. Já o teste rápido do swab de faringe apresenta especificidade de aproximadamente 95% quando comparado à cultura, com sensibilidade entre 70% a 90%, sendo importante a confirmação por cultura dos testes rápidos negativos em crianças e adolescentes (SHULMAN et al., 2012).

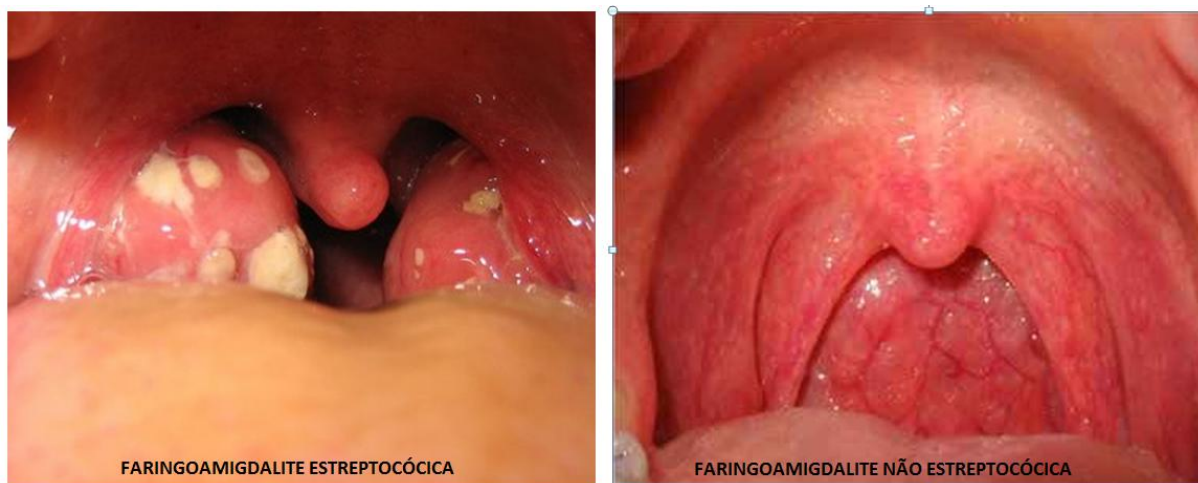


FIGURA 4. FARINGITE ESTREPTOCÓCICA E NÃO ESTREPTOCÓCICA.

FONTE: Disponível em <http://www.mdsaude.com/2009/03/dor-de-garganta-faringite-amigdalite.html> (visualizado em 15/04/2014)

4.1.4 Diagnóstico e manifestações clínicas da FR

O diagnóstico da FR é clínico, não existindo sinal patognomônico ou exame específico. Os exames laboratoriais, apesar de inespecíficos, sustentam o diagnóstico do processo inflamatório e da infecção estreptocócica. Reagentes de fase aguda como Velocidade de Hemossedimentação (VHS) e Proteína C reativa (CRP) estão elevados durante um episódio de FR aguda, como também podem ser sinais de resolução da FR. A febre, usualmente $\geq 38^{\circ}\text{C}$, é comum no início da FR aguda. Os critérios de Jones, estabelecidos em 1944, modificados em 1992, continuam sendo o “padrão ouro” para o diagnóstico do primeiro surto da FR (Tabela 1). A divisão dos critérios em maiores e menores é baseada na especificidade, e não na frequência da manifestação. Outros sinais e sintomas, como epistaxe, dor abdominal, anorexia, fadiga, perda de peso e palidez podem estar presentes, mas não estão incluídos entre as manifestações dos critérios de Jones (DAJANI et al., 1992).

A probabilidade de FR é alta quando há evidência de infecção estreptocócica anterior, além da presença de pelo menos dois critérios maiores ou um critério maior e dois menores. A coreia, a cardite indolente e as recorrências são três exceções em que os critérios de Jones não têm que ser rigorosamente respeitados; podendo o diagnóstico ser feito sem a presença dos demais sintomas (BARBOSA et al., 2009).

TABELA 1. CRITÉRIOS MODIFICADOS DE JONES NO DIAGNÓSTICO DA FR.

Critérios maiores	Critérios menores
Cardite	Febre
Artrite	Artralgia
Coreia de Sydenham	Elevação dos reagentes de fase aguda (VHS, PCR)
Eritema marginado	Intervalo PR prolongado no ECG
Nódulos subcutâneos	
Evidência de infecção pelo estreptococo do grupo A: cultura de orofaringe e teste rápido para detecção do antígeno do estreptococo e elevação dos títulos de anticorpos (ASLO)	

FONTE: Adaptado de BARBOSA et al., 2009.

A artrite é a manifestação mais comum da FR, presente em 75% dos casos, com evolução autolimitada e sem sequelas. Geralmente evolui de forma assimétrica e migratória, ou seja, quando os sintomas melhoram em uma articulação, aparecem em outra. Afeta principalmente as grandes articulações, particularmente dos membros inferiores. Manifesta-se por dor intensa, inchaço e vermelhidão. O quadro total do processo inflamatório cessa em menos de um mês. Apresenta boa resposta aos anti-inflamatórios não hormonais (BARBOSA et al., 2009; BURKE; CHANG, 2014).

A cardite é a manifestação mais grave da FR, pois é a única que pode deixar sequelas e acarretar óbito. Ocorre entre 40-70% dos primeiros surtos, embora estudos recentes utilizando ecocardiografia demonstraram prevalências mais elevadas. O acometimento cardíaco é caracterizado por pancardite. Entretanto, as lesões valvares são responsáveis pelo quadro clínico e pelo prognóstico (BARBOSA et al., 2009; BURKE; CHANG, 2014).

A coreia de Sydenham ocorre, predominantemente, em crianças e adolescentes do sexo feminino. É uma desordem neurológica caracterizada por movimentos rápidos, involuntários e incoordenados da face, tronco ou extremidades. Também pode haver mudanças de comportamento e labilidade emocional. O surto da coreia dura, em média, de dois a três meses, mas pode prolongar-se por mais de um ano. Geralmente tem manifestação tardia, podendo ocorrer em até 7 meses, após a infecção estreptocócica (REDONDO ROBLES et al., 2014).

O eritema marginado é raro, ocorrendo em <3% dos pacientes. Caracteriza-se por bordas nítidas, centro claro, contornos arredondados ou irregulares. São lesões múltiplas, indolores e não pruriginosas, podendo haver sua fusão, resultando em aspecto serpiginoso. Essa manifestação está associada à cardite, porém não necessariamente, à cardite grave. Os nódulos subcutâneos também são raros, presentes em 2-5 % dos pacientes, e estão fortemente associados à presença de cardite grave. São nódulos múltiplos, arredondados, de tamanhos variados, firmes, móveis, indolores e recobertos por pele normal. Localizam-se sobre proeminências e tendões extensores, geralmente em cotovelos, punhos, joelhos, tornozelos, região occipital, tendão de Aquiles e coluna vertebral (BARASH, 2013; BARBOSA et al., 2009; BURKE; CHANG, 2014).

Artralgia ocorre muitas vezes em múltiplas articulações, sem vermelhidão ou inchaço. Um paciente pode ter artrite ou artralgia como um critério de Jones, mas nunca ambos (BARASH, 2013).

4.1.5 Cardite e Cardiopatia Reumática Crônica

A importância da cardiopatia na FR deve-se ao fato que a mesma é capaz de causar fibrose das válvulas cardíacas, com sérios prejuízos hemodinâmicos ao paciente. O comprometimento cardíaco ocorre em 50 - 75% das crianças no primeiro surto da doença (KUMAR; TANDON, 2013; ZÜHLKE; KARTHIKEYAN, 2013). A cardite reumática pode não se manifestar durante anos ou até mesmo décadas, após o episódio inicial de FR (BARBOSA et al., 2009).

Durante o processo agudo, observam-se lesões inflamatórias focais amplamente disseminadas em vários sítios cardíacos. Estas tendem à cicatrização após a fase aguda. Ainda nos dias atuais, 99% dos casos de estenose mitral são devidos à CRC. A maior parte dos pacientes chega aos serviços médicos após episódios recorrentes, aumentando as chances de comprometimento valvar. Cardites discretas não acompanhadas por outros sintomas da doença podem passar despercebidas, e a lesão valvar pode somente ser evidenciada em exames médicos de rotina ou na ocasião de surtos subsequentes (BARBOSA et al., 2009).

Após uma crise inicial, verifica-se uma vulnerabilidade aumentada à reativação da doença com infecções faríngeas subseqüentes, sendo provável o aparecimento das mesmas manifestações, a cada crise recorrente. Acredita-se que haja agravamento da cardite a cada recidiva, tornando as lesões cumulativas. A CRC é caracterizada principalmente por doença valvar fibrótica deformante, particularmente a estenose mitral, que pode provocar disfunção cardíaca permanente e grave, algumas vezes fatal. Os sinais e sintomas da doença valvar dependem da valva ou valvas acometidas, bem como do grau de acometimento endocárdico, miocárdico e pericárdico. Isoladamente, a valva mitral está afetada em 65 a 70% dos casos enquanto que a mitral e a aórtica, em 25% dos casos (Figura 5). O acometimento das valvas tricúspide e pulmonar é mais raro. A estenose mitral leva ao aumento da câmara atrial esquerda, sopro diastólico mitral, dispnéia e fibrilação atrial, com riscos de formação de trombos e embolização. A insuficiência

mitral gera sopro holossistólico apical tipo regurgitação, além de dilatação atrial esquerda, dispnéia e fibrilação atrial. Os surtos agudos podem romper as cordoalhas tendíneas e levar a edema agudo de pulmão, situação mais freqüente na endocardite infecciosa. A valvopatia aórtica pode levar tanto à dilatação, quanto à hipertrofia de ventrículo esquerdo e sopro de regurgitação aórtica. Comprometimento pericárdico pode levar ao depósito de fibrina e à pericardite, com sinais de atrito pericárdico ou sinais de tamponamento pericárdico, se houver derrame. Em casos de processo agudo, pode haver taquicardia sinusal, sopro de regurgitação mitral, atrito pericárdico e cardiomegalia (BONOW; LIBBY; MANN, 2009; KASPER; FANCI; BRAUNWALD, 2002).

Apesar das evidências histológicas e imunológicas do envolvimento do miocárdio, a insuficiência cardíaca é causada pela lesão valvar (valvite), e não pelo acometimento miocárdico. O prognóstico a longo prazo é variável, podendo-se observar um ciclo inexorável de deformidade valvar produzindo anormalidades hemodinâmicas, gerando mais fibrose deformante. A substituição cirúrgica das valvas acometidas melhora consideravelmente o prognóstico (BARBOSA et al., 2009; BONOW; LIBBY; MANN, 2009; KASPER; FANCI; BRAUNWALD, 2002).

Ordem do acometimento valvar na cardite reumática

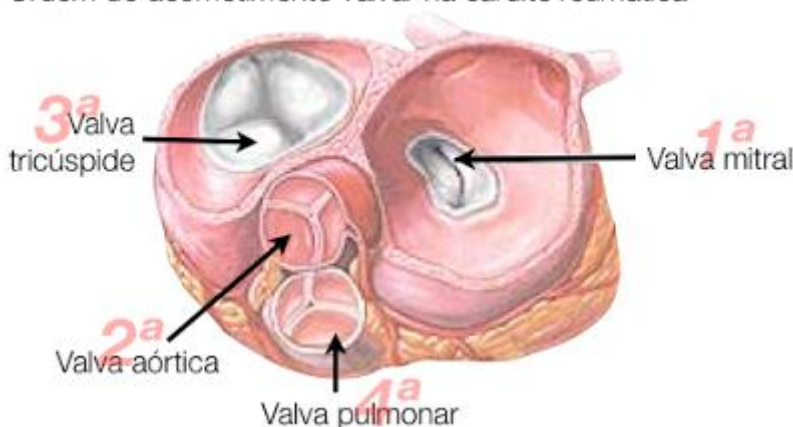


FIGURA 5: ORDEM DO ACOMETIMENTO VALVAR NA CARDITE REUMÁTICA

FONTE: Disponível em <http://pedrorpb.blogspot.com.br/2009/06/febre-reumatica-criterios-de-jones.html> (visualizado em 15/04/2014)

4.1.6 Tratamento da FR

O objetivo do tratamento da FR aguda é suprimir o processo inflamatório, minimizando as repercussões clínicas sobre o coração, articulações e sistema nervoso central, além de erradicar o EGA da orofaringe e promover o alívio dos principais sintomas. O tratamento da faringoamigdalite e a erradicação do EGA da orofaringe devem ser feitos na vigência da suspeita clínica da FR, independentemente do resultado da cultura de orofaringe. Dentre os antibióticos possíveis, o de escolha é a penicilina G benzatina, em virtude da comprovada suscetibilidade do estreptococo, ação bactericida, eficácia clínica e bacteriológica da droga. Além da baixa incidência de efeitos colaterais, boa aderência ao esquema instituído, baixo espectro e baixo custo. A resistência do EGA à penicilina ainda não foi documentada e a dose única intramuscular é preferível para pacientes com alta probabilidade de não completarem o tratamento via oral (BARBOSA et al., 2009; IRLAM et al., 2013; REMENYI et al., 2013).

Além da antibioticoterapia, tratam-se os demais sinais e sintomas do surto agudo de acordo com cada paciente. Por exemplo, para a artrite geralmente utilizam-se anti-inflamatórios não esteroides; na cardite utilizam-se corticoides e medicamentos para a insuficiência cardíaca, quando for o caso; para o tratamento da coreia pode-se usar haloperidol, ácido valpróico e carbamazepina; no caso de febre pode-se utilizar paracetamol e dipirona; além da hospitalização e repouso, quando se achar necessário (BARBOSA et al., 2009; IRLAM et al., 2013).

A profilaxia secundária consiste na administração contínua de penicilina benzatina ao paciente com FR prévia ou CRC comprovada, com o objetivo de prevenir colonização ou infecção de via aérea superior pelo EGA. A duração da profilaxia depende da idade do paciente, do intervalo do último surto, da presença de cardite no surto inicial, do número de recidivas, da condição social e da gravidade da CRC residual (BARBOSA et al., 2009; IRLAM et al., 2013; ROBERTS et al., 2013).

4.1.7 Vacina

Atualmente existem diversos estudos para o desenvolvimento de vacina contra o *S. pyogenes*, para prevenir a infecção e suas complicações. Diversas propostas à vacina contra o EGA estão em vários estágios de desenvolvimento pré-clínico e clínico (GUILHERME et al., 2011). Muitas delas estão voltadas na proteína M, devido sua alta imunogenicidade. As primeiras vacinas utilizavam a bactéria inteira inativada. O uso da proteína M total de cepas específicas começou em 1979, mas os resultados não foram satisfatórios. Na década de 1980, modelos utilizando peptídeo sintético foram introduzidos. Posteriormente modelos utilizando biologia molecular foram desenvolvidos para vacinas hexavalentes e 26-valente contendo os sorotipos mais prevalentes nos Estados Unidos (STEER; DALE; CARAPETIS, 2013). Simultaneamente, novas abordagens para a definição de epítomos protetores foram concebidas com base em regiões M e C-terminais (MCNEIL et al., 2005). Atualmente modelos baseados em antígenos estreptocócicos diferentes da proteína M estão sendo investigados (DE AMICIS et al., 2013).

As vacinas contendo antígenos conservados do EGA contêm antígenos compartilhados entre diferentes sorotipos, incluindo:

- (1) regiões conservadas da proteína M: epítomo mínimo J8/J14/p145; região conservada totalmente C-repetido; epítomos C-repetidos (vacina StreptInCor); epítomos C-repetidos. Estas vacinas possuem evidência de serem seguras, bem toleradas e induzem anticorpos funcionais contra todos os sorotipos de GAS utilizados.
- (2) antígenos comuns não-proteína M: carboidratos do estreptococo; antígeno protetor estreptocócico; C5a peptidase; proteína ligante de fibronectina; fator de opacidade sérica; exotoxina B pirogênica estreptocócica (protease cisteína extracelular); exotoxina pirogênica estreptocócica; pili (antígeno T); serina protease (SpyCEP); serina esterase (Sse); GAS 40; nove antígenos comuns; proteína ligante alfa2-macroglobulina G-relacionada (GRAB); transportador de metal de estreptococos (MtsA); superóxido dismutase; lipoproteínas; e a vacina baseada em vetor: *Streptococcus gordonii*. A maioria destas vacinas tem demonstrado variados níveis de proteção em modelos animais (DALE et al., 2013).

No Brasil, o laboratório de imunologia do Instituto do Coração (InCor), do Hospital de Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da USP, desenvolveu uma vacina baseada na região C-terminal da proteína M. A vacina StreptinCor está na etapa dos testes clínicos, demonstrando ser segura e com potencial de proteção e possibilitará o acesso a pessoas de baixa renda (GUILHERME; KALIL, 2013).

4.2 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é parte importante da resposta imune inata com relevante papel na defesa do hospedeiro contra patógenos invasores (LAARMAN et al., 2010). O complemento consiste em proteínas séricas e de superfície celular, que interagem umas com as outras, numa rede muito bem regulada, servindo como substratos, enzimas ou moduladores de uma série de cascatas proteolíticas extracelulares (LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008). Interagindo com outras moléculas do sistema imune, estas proteínas geram produtos capazes de eliminar microrganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). O sistema complemento funciona como a “espinha dorsal” da imunidade inata interligando essa ao sistema imune adaptativo, modulando a resposta do linfócito B, aumentando a memória imunológica e regulando a atividade do linfócito T (MAYILYAN, 2012).

O nome “complemento” é derivado dos experimentos realizados por Jules Bordet em 1896, pouco depois da descoberta dos anticorpos. Ele demonstrou que, ao se adicionar soro fresco contendo anticorpo antibacteriano a bactérias à temperatura ambiente (37°C), a bactéria era lisada. Se, no entanto, o soro fosse aquecido a 56°C ou mais, ele perderia sua capacidade lítica. Essa perda de capacidade lítica não se deve ao decaimento da atividade dos anticorpos, uma vez que os anticorpos são relativamente termoestáveis e, ainda assim, o soro aquecido seria capaz de aglutinar bactérias. Bordet concluiu então que o soro devia conter outro componente termolábil que auxiliava, ou “complementava”, a função lítica dos anticorpos, e a esse componente foi dado, posteriormente, o nome de complemento (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; DUNKELBERGER; SONG, 2010; SCHMALSTIEG; GOLDMAN, 2009).

Atualmente, mais de 40 componentes do complemento já foram descritos (MAYILYAN, 2012), correspondendo a aproximadamente 3 g/L das proteínas séricas e constituindo mais de 15% da fração globular do plasma (DUNKELBERGER; SONG, 2010). As proteínas do complemento são produzidas por uma variedade de células, incluindo hepatócitos, macrófagos e células epiteliais do intestino (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

O complemento está envolvido em diversos processos da defesa antimicrobiana (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011; STÄGER et al., 2003). Entre essas ações biológicas destacam-se a opsonização e fagocitose, recrutamento e ativação de células inflamatórias incluindo polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos, participação na regulação da resposta de anticorpos e eliminação de complexos imunes e células apoptóticas. Por outro lado, a ativação exacerbada do complemento pode trazer efeitos nocivos para o hospedeiro, contribuindo para a inflamação e danos tissulares (Figura 6) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011; STÄGER et al., 2003). O sistema complemento pode ser ativado através de três vias: clássica, alternativa e das lectinas (Figura 7). A ativação da via clássica envolve reações sequenciais envolvendo C1, C4, C2 e C3. C1 é um complexo multimolecular dependente de Ca^{++} composto por três proteínas: C1q, C1r e C1s. C1q não possui atividade enzimática. Tal atividade de serina protease cabe a C1r e C1s. A ativação da via clássica se inicia com a ligação de C1q aos domínios Fc de IgM e IgG (sub-classes IgG1, IgG2 e IgG3 – IgG4 não ativa complemento) ou pelo reconhecimento direto de alguns microrganismos e da proteína C reativa (CRP), levando a ativação de C1r que ativa C1s. A ativação de C1s leva à clivagem de C2 e C4, com posterior formação da C3 convertase C4b2a, enzima proteolítica responsável pela clivagem de C3, o componente central presente em todas as vias, em C3a e C3b. C3b liga-se aos alvos e os opsoniza, promovendo sua eliminação por fagocitose ou se liga à C3 convertase, para formar C5 convertase (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; DEGN; THIEL, 2013; MAYILYAN, 2012). A clivagem de C5 em C5a e C5b pela C5 convertase inicia a formação do complexo de ataque a membrana (MAC), o qual é composto pelas proteínas C5b, C6, C7, C8 e 10 a 18 moléculas de C9. A inserção do MAC na bicamada lipídica causa a lise osmótica da célula alvo (MAYILYAN, 2012).

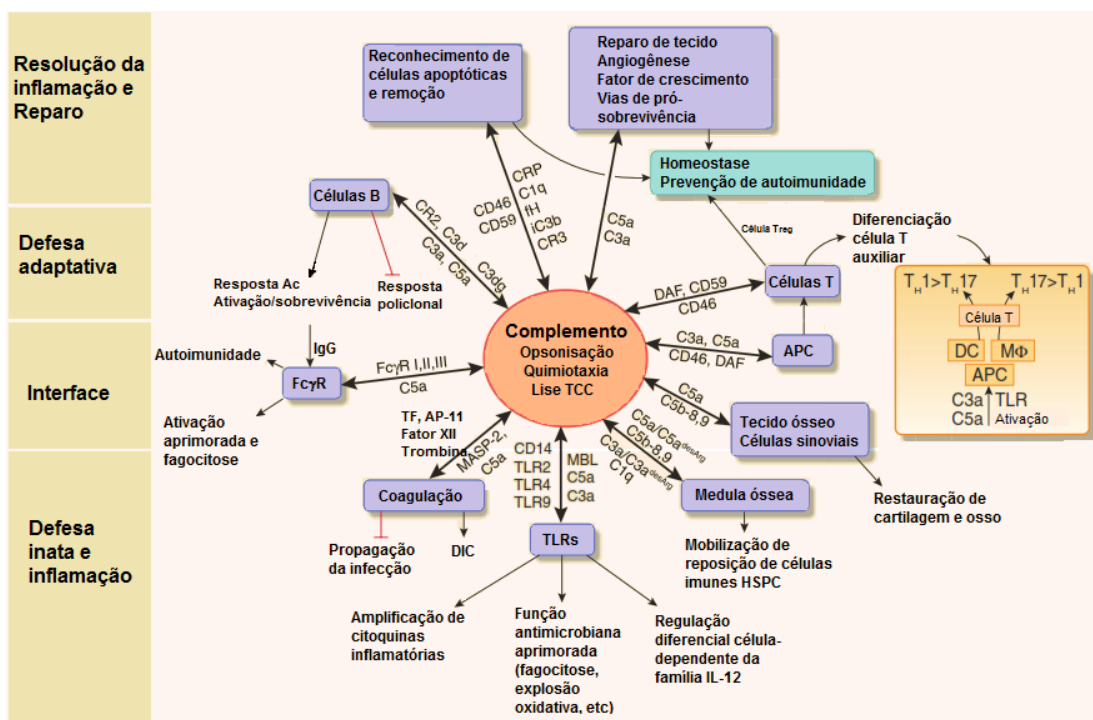


FIGURA 6. PAPEL INTEGRADOR DO COMPLEMENTO NA DEFESA DO HOSPEDEIRO E HOMEOSTASE

NOTA: As funções tradicionais do complemento (em oval) e seu papel na imunidade e homeostasia são mostrados (participações de moléculas chaves são indicadas ao lado das setas).

LEGENDA: Ac: anticorpo; APC: célula apresentadora de antígeno; CD: diferenciação de agrupamento; FcγR: receptor da porção Fc; IgG: Imunoglobulina G; DAF: fator de aceleração de decaimento; TLR: receptor tipo Toll; T_H: T auxiliar; TCC: complexo terminal do complemento; HSPC: hiperplasia suprarrenal congênita, DIC: coagulação intravascular disseminada; Mφ: macrófagos.

FONTE: RICKLIN et al., 2010.

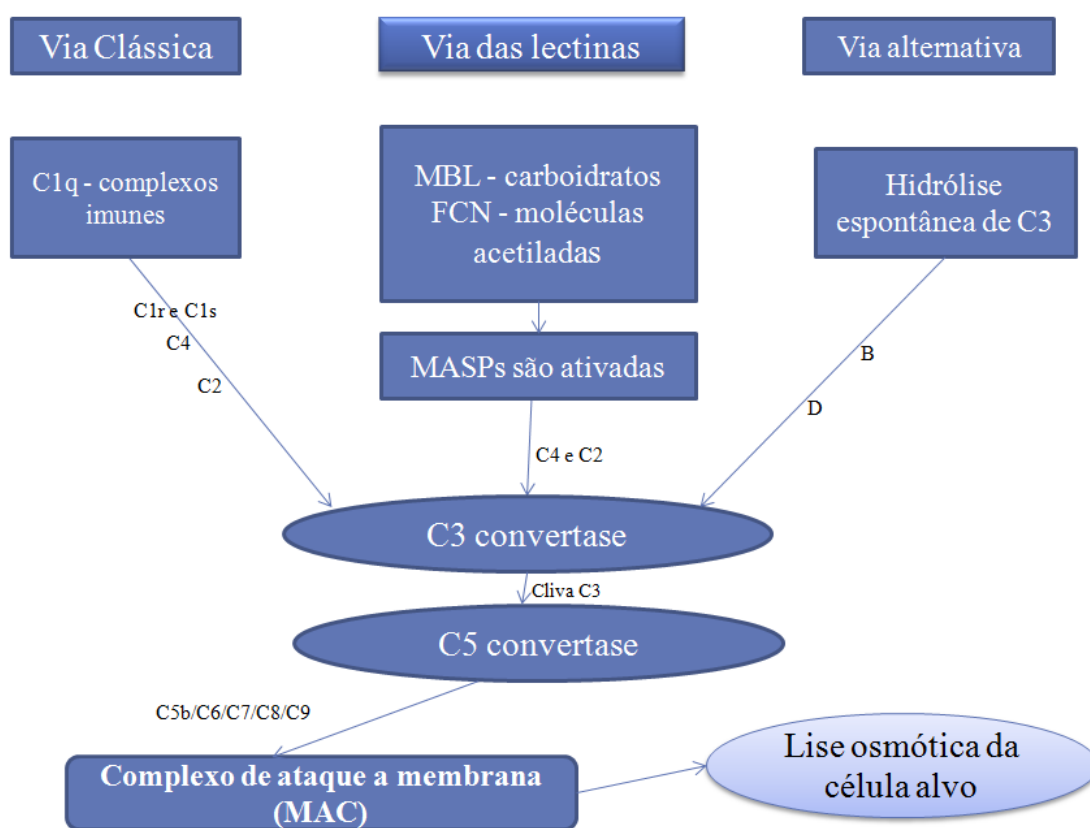


FIGURA 7. VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.

NOTA: A ativação do sistema complemento pode ser iniciada por três vias distintas, as quais levam à produção de C3b. C3b inicia os passos finais da ativação do complemento, culminando na produção de peptídeos que estimulam a inflamação (C5a) e na polimerização de C9, que forma o complexo de ataque à membrana (MAC).

FONTE: o autor.

A via alternativa é ativada pela hidrólise espontânea de C3 em C3(H₂O), um análogo de C3b (DUNKELBERGER; SONG, 2010). Em sua forma nativa, C3, a molécula central da via alternativa, tem poucos ligantes e é relativamente inerte. Entretanto, uma pequena parte das moléculas de C3 é hidrolisada para C3(H₂O), expondo novos sítios de ligação (RICKLIN et al., 2010). Dessa forma, a via alternativa é constantemente auto-ativada, sendo inibida nas superfícies celulares próprias por fatores inibidores do complemento, mas se propaga em superfícies não próprias (DEGN; THIEL, 2013). Em superfícies ativadoras, C3(H₂O) se liga ao fator B, gerando a C3 convertase e clivagem de C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b se liga ao fator B, originando um complexo C3bB. O fator D cliva o fator B ligado ao

C3b, formando C3bBb (a C3 convertase da via alternativa). A deposição de C3b em células autólogas é rapidamente impedida pela ação de proteínas reguladoras, como o fator I e seus cofatores (fator H, cofator de membrana para proteína – MCP, proteína de ligação ao C4 – C4BP, receptor de complemento tipo 1 – CR1) e o fator de aceleração do decaimento (DAF). Uma proteína chamada properdina estabiliza o complexo C3bBb, o qual tem capacidade equivalente a C3 convertase da via clássica C4b2a (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; DUNKELBERGER; SONG, 2010).

A via das lectinas é iniciada pela ligação da lectina ligante de manose (MBL) ou ficolinas (ficolina-1, ficolina-2 e ficolina-3) a carboidratos ou moléculas acetiladas, respectivamente, na superfície de patógenos. Essas lectinas estão complexadas com serina proteases chamadas serina protease associada à MBL (MASPs) (MATSUSHITA; ENDO; FUJITA, 2013). Após a ligação da MBL ou ficolinas aos seus alvos, as MASPs associadas a essas moléculas são ativadas, provavelmente de maneira análoga ao complexo C1 (DEGN; THIEL, 2013). As serina proteases conhecidas são: MASP-1, MASP-2 e MASP-3 (serina proteases associadas a MBL-1, -2 e -3). MASP-1 (DEGN et al., 2012) e MASP-2 são essenciais para a formação das C3 e C5 convertases da via das lectinas (C4b2a e C4b2a(C3b)_n). MASP-1 ativa C2 e pode clivar C3 diretamente levando à ativação da via alternativa. Similarmente a C1s, MASP-2 ativada cliva C4 e C2. O fragmento C4b se liga a C2a, gerando C4b2a, a C3 convertase das vias clássica e das lectinas (ALI et al., 2012) (Figura 8). Após a clivagem de C2 e C4 pela MASP-2, a ativação prossegue de modo similar a da via clássica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; MAYILYAN, 2012).

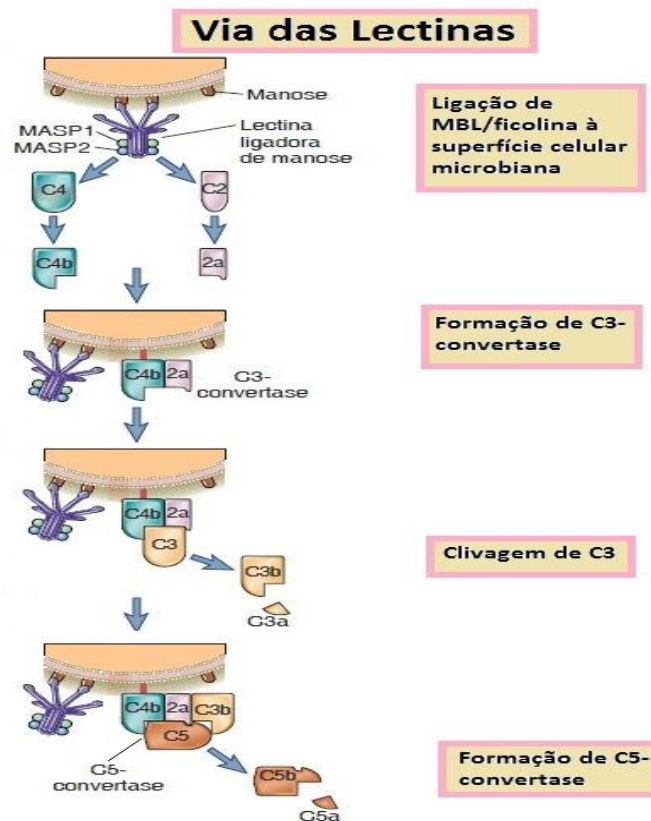


FIGURA 8. ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS DO COMPLEMENTO

NOTA: A via das lectinas é ativada pela ligação de uma lectina plasmática a microrganismos. O C3b que é produzido pela ação da C3 convertase liga-se à superfície da célula microbiana ou a anticorpos e se torna um componente da enzima que cliva C5 (C5-convertase) e inicia as etapas finais da ativação do complemento.

FONTE: ABBAS et al., 2012

Os produtos de clivagem das proteínas do complemento, especialmente de C3, C4 e C5, promovem múltiplos efeitos biológicos (Figura 9). As anafilatoxinas C3a e C5a são potentes mediadores inflamatórios, causando contração da musculatura lisa e degranulação de basófilos e mastócitos, com liberação de histamina e outras substâncias vasoativas. Além disso, C5a é um potente fator quimiotático para células fagocíticas, causando sua ativação e a liberação de enzimas lisossomais e radicais de oxigênio. Já C3b e C4b previnem a agregação de complexos imunes e promovem seu transporte, predominantemente através da ligação ao receptor 1 do complemento (CR1) em células fagocíticas e hemácias. Por sua vez, o complexo lítico terminal C5b-9 exibe efeito lesivo sobre membranas celulares e, uma vez associado a estas, promove lise osmótica (MURPHY;

TRAVERS; WALPORT, 2008). Na tabela 2 estão relacionadas as principais proteínas envolvidas na cascata do complemento.

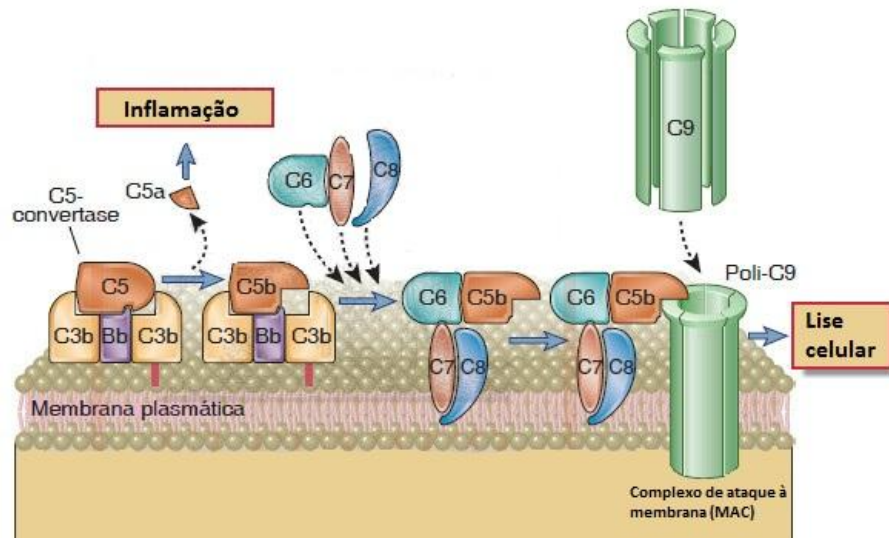


FIGURA 9. ETAPAS FINAIS DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO

NOTA: Representação esquemática dos eventos que ocorrem na superfície celular e levam à formação do MAC. A C5-convertase associada à membrana celular cliva C5 e gera C5b, o qual se liga à convertase. C6 e C7 ligam-se sequencialmente a C5b, e o complexo C5b67 se insere diretamente na bicamada lipídica da membrana plasmática, seguido pela inserção estável de C8. Até 18 moléculas de C9 podem, então, polimerizar-se ao redor do complexo para formar o MAC, o qual forma poros na membrana celular e induz a lise osmótica da mesma. O C5a liberado na proteólise de C5 estimula a inflamação.

FONTE: ABBAS et al., 2012.

TABELA 2. PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CASCATA DO COMPLEMENTO

Proteínas que atuam no reconhecimento de PAMP e DAMP#	Nomes alternativos	Funções
C1q		Parte do complexo C1; reconhece IgG, IgM, CRP e PAMP ligados em superfícies; Inicia Via clássica
MBL		Reconhece carboidratos próprios; inicia via das lectinas
Ficolina-1	ficolina- M	Reconhece carboidratos próprios; inicia via das lectinas
Ficolina-2	ficolina-L	Reconhece carboidratos próprios; inicia via das lectinas
Ficolina-3	ficolina-H	Reconhece carboidratos próprios; inicia via das lectinas
Properdina	Fator P	Reconhece PAMP e DAMP; inicia via alternativa; estabiliza as convertases da via alternativa
CRP ^a		Reconhece DAMP e PAMP em células apoptóticas e microbianas; liga C1q
CFHR-4	FHR-4	Recruta CRP monomérica de células necróticas; facilita a ativação da via clássica e C1q
Proteases	Nomes alternativos	Funções
C1r		Parte do complexo C1; cliva C1s
C1s		Parte do complexo C1; cliva C2 e C4
MASP-1		Liga-se a MBL/ficolinas; cliva C2 (mas não C4); pode clivar MASP-2 e C3; ativa pró-FD; provável função na cascata da coagulação
MASP-2		Liga-se a MBL/ficolinas; cliva C2 e C4
MASP-3		Desconhecida (liga-se a MBL/ficolinas, mas não cliva C2 e C4)
C2		Parte das convertases da via clássica e lectina; cliva C3/C5
Fator B	CFB	Parte das convertases C3/C5 da via alternativa; cliva C3/C5
Fator D	CFD	Cliva C3b ligado a FB para formar as convertases C3/C5 da Via alternativa
Fator I	CFI	Degrada C3b e C4b
Componentes do complemento	Nomes alternativos	Funções
C3		Precursor da anafilotoxina C3a, opsonina C3b e sinaliza fragmentos (iC3b, C3dg, C3d); parte da convertases C3 e toda C5 da via alternativa
C4		Precursor da opsonina C4b; parte das convertases da via clássica e via das lectinas
C5		Precursor das anafilotoxinas C5a e C5b/TCC
C6		Parte do MAC (inserção de membrana)
C7		Parte do MAC (inserção de membrana)
C8		Parte do MAC (indução da formação do poro)
C9		Parte do MAC (forma o poro lítico)
Receptores ^b	Nomes alternativos	Funções
CR1	CD35; C3b/C4b-receptor	Liga-se a C3b/iC3b; induz fagocitose; acelera o declínio das convertases; cofator para FI
CR2	CD21; receptor C3d	Liga-se iC3b/C3dg/C3d; diminui o limiar de estimulação das células B
CR3	CD11b/CD18; Mac-1; integrina $\alpha_M\beta_2$	Induz fagocitose através de interação com iC3b; modula a família IL-12 em APCs
CR4	CD11c/CD18; p150/95; integrina $\alpha_x\beta_2$	Induz fagocitose através de interação com iC3b
C3aR		Liga-se a C3a; disparo da sinalização pró-inflamatória
C5aR	CD88	Liga-se a C5a; disparo da sinalização pró-inflamatória
C5L2	GPR77	Liga-se a C5a (fortemente) e C5a ^{desArg} (fracamente); pode ligar-se a C3a/C3a ^{desArg} ; função não totalmente definida
CRlg	Z93lg, VSIG4	Induz fagocitose através de interação com iC3b/C3c; efeito regulador da C5 convertase
cC1qR	Calreticulina; receptor de colectina	Reconhece C1q ligada; induz sinalização da fagocitose através de CD91
gC1qR	C1qbp (proteína ligante C1q); p33	Reconhece C1q; potencial função na fagocitose e sinalização; modula IL-12 em APCs
C1qRp	(CD93+mediador desconhecido)	Parte do complexo receptor que se liga a C1q e media fagocitose

LEGENDA: CR: receptor de complemento; Mac-1: antígeno 1 de macrófago; ^a: embora CRP seja o mediador representante melhor descrito desta categoria, outras pentraxinas podem exercer funções similares; ^b: receptores adicionais para C1q (por exemplo, Cr1, α integrina, SIGN-r1 murino) foram propostos, mas ainda não confirmados. #PAMP: padrões moleculares associados a patógenos; #DAMP: padrões moleculares associados a danos celulares; CR: receptor de complemento; CRP: proteína C reativa; CFHR: proteína relacionada ao fator H do complemento; Mac-1: antígeno 1 do macrófago.

FONTE: RICKLIN et al., 2010.

4.2.1 Regulação da ativação do complemento

Devido ao efeito danoso do complemento e a maneira pela qual sua ativação é rapidamente amplificada através de uma cascata enzimática, diversos mecanismos previnem sua ativação descontrolada (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2008). A ativação do complemento precisa ser regulada por duas razões. Em primeiro lugar, a ativação de pequenos níveis de complemento ocorre espontaneamente, e se tal ativação prosseguir, o resultado pode ser danoso para as células autólogas normais e tecidos. Em segundo lugar, mesmo quando o complemento é ativado por microrganismos estranhos como bactérias ou por complexos antígeno-anticorpo, ele precisa ser controlado, pois os produtos de degradação das proteínas do complemento podem se difundir para as células adjacentes e causar injúria. Diferentes mecanismos reguladores inibem a formação das C3 convertases em etapas iniciais da ativação do complemento, inativam C3 e C5 convertases e inibem a formação de MAC em etapas posteriores da ativação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). A regulação do complemento é mediada por várias proteínas circulantes e de membrana celular (Tabela 3). Muitas dessas proteínas, bem como várias proteínas das vias clássica e alternativa pertencem a uma família chamada reguladores da atividade do complemento (RCA) e são codificados por genes homólogos, localizados adjacentes no genoma (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

TABELA 3: REGULADORES DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO

Reguladores	Nomes alternativos	Funções
C1-INH	SERPIN1	Inibe C1r/s e MASPs
CR1	CD35; C3b/C4b-receptor	Liga C3b/iC3b; induz fagocitose; acelera o decaimento de convertases; cofator para fI.
MAP-1	MAP44	Liga-se a MBL/ficolinas; inibe a deposição de C4
C4BP	Proteína ligante de C4	Acelera o declínio das convertases da via clássica e das lectinas; cofator para fI
Fator I	fI	Função de serino-protease, cliva C3b e C4b usando fator H, MCP, C4BP ou CR1 como cofatores
Fator H	CFH	Reconhece superfícies próprias; acelera o declínio da convertase; cofator para fI
FHL-1	Reconectina, CFHL1	Acelera o declínio da convertase; cofator para Fi
MCP	CD46	Cofator para fI
DAF	CD55	Acelera o declínio das convertases
CFHR-1	FHR-1	Reconhece superfícies próprias e C5; inibe a clivagem C5 e formação de MAC
CD59	protectina	Liga-se a C8 e C9; previne a formação do MAC
Vitronectina	Proteína S; S40	Liga-se a C5b-9; previne a formação do MAC
Clusterina	Apolipoproteína J; SP-40, 40	Liga-se a C7-C9; prevenindo a formação do MAC
Carboxipeptidase-N		Degrada C3a e C5a para suas formas desArg

LEGENDA: CFHR: proteína relacionada ao fator H do complemento; DAF: fator de adelação de decaimento; CR: receptor de complemento.

FONTE: RICKLIN et al., 2010.

4.2.2 Deficiências de complemento

Deficiências genéticas de proteínas do complemento e de proteínas reguladoras são causas de várias doenças humanas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Estas deficiências podem ocorrer devido a polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), deleção parcial ou inserção. Além disso, mais de um polimorfismo genético pode causar a deficiência de certos componentes (MAYILYAN, 2012).

Para os componentes da via clássica, ocorrem deficiências genéticas para C1q, C1r, C4, C2 e C3, sendo que a deficiência de C2 é a mais comum (frequência da deficiência heterozigótica: 1:100 nascidos vivos; para homozigose é 1:10.000) (HESS; STEIGER; SCHIFFERLI, 1998). Além do comprometimento da defesa contra microrganismos, deficiências hereditárias do complemento predispoem a condições autoimunes (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011). Mais de

50% dos pacientes com deficiência de C2 e C4 desenvolvem lúpus eritematoso sistêmico. Deficiência de C3 está associada a infecções bacterianas piogênicas graves, que podem ser fatais. Este fato ilustra o papel central de C3 na opsonização, fagocitose e destruição desses microrganismos. Deficiências nos componentes da via alternativa, incluindo properdina e fator D, resultam em aumento da suscetibilidade a infecções por bactérias piogênicas.

Deficiências dos componentes da via das lectinas aumentam a suscetibilidade à infecção de uma forma muito variada. Deficiência de MBL tem sido associada com aumento do risco de infecções (BRONKHORST et al., 2013). E em combinação com outras imunodeficiências, a deficiência de MBL é um fator de risco para diferentes infecções do trato respiratório (SKATTUM et al., 2011). Além disso, variantes de *MBL2* podem conferir um risco maior a doenças cardiovasculares (MADSEN et al., 1998). Deficiência de ficolina-3 foi recentemente associada com infecções respiratórias, abscesso cerebral e episódios de pneumonia (MUNTHER-FOG et al., 2009). Estudos recentes observaram consequências graves, como a síndrome 3MC, para mutações em genes que codificam proteínas da via das lectinas, como *MASP1* (ROORYCK et al., 2011). Deficiências de MASP-2 serão discutidas no próximo tópico.

Deficiência de componentes da via terminal do complemento incluem C5, C6, C7, C8 e C9. O principal problema clínico nesses pacientes é a propensão para infecções disseminadas. Deficiências nas proteínas reguladoras do complemento estão associadas com ativação anormal e uma variedade de anormalidades clínicas incluindo aumento de infecções com bactérias piogênicas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Muitas deficiências hereditárias do complemento têm sido reveladas através da associação com infecções por bactérias invasivas. Esta susceptibilidade parece estar restrita a um número limitado de bactérias, que apresentam mecanismos de escape ao sistema complemento tais como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de vários outros microrganismos (DEGN; JENSENIUS; THIEL, 2011).

A tabela 4 apresenta um resumo das principais deficiências dos componentes do complemento (SKATTUM et al., 2011).

TABELA 4. DEFICIÊNCIAS DO COMPLEMENTO GENETICAMENTE DETERMINADAS E ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS.

Proteína ^a	Genética	No. Casos publicados/frequência	Suscetibilidade a infecção e microrganismos tipicamente envolvidos	Outras associações a doenças
C1q	Autossômica recessiva; 11 diferentes mutações encontradas, a mais frequente é g.2687C>T do C1qA, que conduz a um códon de parada.	50 - 100	Sepse, meningite, pneumonia. Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis	LES/doença semelhante ao LES
C1r/C1s	Autossômica recessiva	<20	Sepse, meningite, pneumonia devido a bactérias encapsuladas.	LES/doença semelhante ao LES
C4	Autossômica recessiva	20-50	Sepse, meningite, pneumonia devido a bactérias encapsuladas.	LES/doença semelhante ao LES, glomerulonefrite.
C2	Autossômica recessiva >90% causada por deleção no gene C2	1/20.000	Sepse, pneumonia, meningite, osteíte. S. pneumoniae, S. aureus, N. meningitidis.	LES/doença semelhante ao LES, Doença cardiovascular
C3	Autossômica recessiva	20-50	Infecções trato respiratório, meningite. N. meningitidis, S. pneumoniae, H. influenzae, S. pyodenes, S. aureus	Doença por deposição de imunocomplexo; glomerulonefrite; vasculite; artralgia; LES/doença semelhante ao LES
Fator D	Autossômica recessiva	<20	Meningite, sepse devido a <i>N. meningitidis</i>	Não
Properdina	Ligado ao X, diversas mutações descritas.	100-500	Meningite, sepse devido a <i>N. meningitidis</i> (uma família teve infecções respiratórias recorrentes e otite média)	Não
MBL	Concentrações séricas de MBL funcional são influenciadas por polimorfismos comuns no exon 1 e na região promotora	5-15% dos euro-descendentes	Infecções do trato respiratório, principalmente em crianças e em combinação com outras imunodeficiências primárias ou secundárias. Aumento da susceptibilidade à tuberculose e à malária.	Doenças cardiovasculares
MASP-2	Autossômica recessiva; SNP D120G tem frequência alélica de 1-3% em euro-descendentes.	<20	Infecções recorrentes do trato respiratório (ao menos 3 casos assintomáticos)	Sintomas inflamatórios/autoimunes
Ficolina-3	Autossômica recessiva; mutação frameshift com frequência alélica de 0,01	1	Infecções do trato respiratório, abscesso cerebral. S. pneumoniae, H. influenza, P. aeruginosa	Trombocitopenia
C5	Autossômica recessiva	20-50	Meningite, sepse devido a <i>N. meningitidis</i>	Não
C6	Autossômica recessiva	50-100	Meningite, sepse devido a <i>N. meningitidis</i>	Não

CONTINUA

CONTINUAÇÃO DA TABELA 3

Proteína ^a	Genética	No. Casos publicados/freqüência	Suscetibilidade a infecção e microrganismos tipicamente envolvidos	Outras associações a doenças
C7	Autossômica recessiva	50-100	Meningite, sepse devido a <i>N. meningitidis</i>	Não
C8	Autossômica recessiva	50-100	Meningite, sepse devido a <i>N. meningitidis</i>	Não
C9	Autossômica recessiva	1/1000 em japoneses; rara em outras populações	Meningite, sepse devido a <i>N. meningitidis</i>	Não
Fator H	Autossômica recessiva, deficiência homozigota	<50	Infecções piogênicas recorrentes. <i>N. meningitidis</i> , <i>H. influenza</i>	Glomerulonefrite membrano-proliferativa, alguns casos de aHUS, degeneração macular
CFHR1 e 3	84 kbp deleção do cromossomo 1	5% dos europeus, quase 100% dos casos DEAP-HUS	Não	DEAP-HUS (deficiência de CFHR) proteínas plasmáticas e autoanticorpos positivo para aHUS
Fator I	Autossômica recessiva, deficiência homozigota	20-50	Infecções piogênicas recorrentes do trato respiratório. <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenza</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>S. pyogenes</i>	Doença relacionada a imuno-complexos; glomerulonefrite; vasculite; artralgia; LES
Inibidor de C1	Autossômica dominante; >200 mutações relatadas	1/50.000	Não	Angiodema hereditário
CD59, CD55	Mutações somáticas de PIG-A levando a baixa ou ausente expressão de GPI-proteínas ancoradas	1-2/1.000.000	Infecções relacionadas somente a citopenias associadas	Trombose, citopenia hematopoiética
CR3/CR4 ^b	Autossômica recessiva; diferentes mutações encontradas, com diversos efeitos clínicos	1/1.000.000	Infecções oportunistas graves. <i>S. aureus</i> e bactérias gram negativas	Não

LEGENDA: ^a: Até o momento não foi relatada deficiência completa de: fator B, proteína ligante de C4b, MASP-1, MASP-3, Ficolina-1 ou Ficolina-2; ^b: deficiência de adesão de leucócitos 1; aHUS: síndrome urêmica hemolítica atípica; LES – Lupus eritematoso sistêmico, CFHR: fator de complemento H-relacionado.

FONTE: SKATTUM et al., 2011.

4.2.3 MASP-2

Em 1992 uma nova enzima com a capacidade de levar à formação da C3 convertase C4b2a foi descrita, a qual denominaram de *MBL-associated serine protease 1* (MASP-1, serina protease 1 associada a MBL) (MATSUSHITA; FUJITA, 1992). Cinco anos depois, foi demonstrado que tal atividade também era mediada por outra enzima, então denominada *MBL-associated serine protease 2* (MASP-2)

(THIEL et al., 1997). Posteriormente, foram identificadas a MASP-3 (STOVER et al., 2003) e uma proteína não-enzimática denominada MAp-19 ou sMAP – um fragmento da MASP-2 com quatro aminoácidos adicionais, que é decorrente de processamento alternativo do transcrito primário do gene *MASP2* (STOVER et al., 1999; TAKAHASHI et al., 1999). MAp44 é um inibidor competitivo da ativação da via das lectinas, deslocando MASP-2 de MBL/ficolinas e inibindo a clivagem de C4 e C2 (DEGN et al., 2009).

A MASP-2 é codificada pelo gene *MASP2* situado no braço curto do cromossomo 1 (1p36.23-31). Seu promotor é regulado pelo ativador 3 de transcrição e transdução de sinal (STAT3) e pelas interleucinas pro-inflamatórias IL-1b e IL-6 (UNTERBERGER et al., 2007). Portanto, sob condições fisiologicamente normais, a expressão do gene *MASP2* deve manter-se estável. De fato, isto foi observado com relação às concentrações séricas de MASP-2 em indivíduos saudáveis ao longo do tempo (YTTING et al., 2007). Contudo, as concentrações podem variar cerca de 100 vezes entre os indivíduos devido a polimorfismos codificadores e não codificadores (intrônicos) do gene *MASP2* (MØLLER-KRISTENSEN et al., 2003; BOLDT et al., 2011).

O mRNA do gene *MASP2* é codificado por 12 exons distribuídos por 20 Kb, do qual um único exon codifica a região de ligação e o domínio serina protease (STOVER et al., 2001). MASP-2 é a mais conhecida serina protease da via das lectinas, sendo composta de seis módulos e uma região ligante (Figura 10): um domínio CUB N-terminal (CUB1 – C1r/C1s, UegF e domínio morfogênico proteína de osso 1), seguido por um domínio tipo fator de crescimento epidérmico (EGF) de ligação dependente de Ca^{+2} , um segundo domínio CUB (CUB-2), dois módulos contíguos de proteínas de controle do complemento (CCP1 e CCP2), um ligante curto e, finalmente, um domínio serina protease (SP) tipo quimotripsina (SØRENSEN; THIEL; JENSENIUS, 2005). A interação com MBL e ficolina-2 é dependente de cálcio e determinada pela porção CUB1-EGF, e é reforçada pelo módulo CUB2. Os dois domínios CCP e o domínio SP executam a atividade catalítica, sendo que CCP2 retem o papel essencial na clivagem de C4 (FEINBERG et al., 2003; YONGQING et al., 2012). Embora MASP-1 ative MASP-2 na geração da C3 convertase (HÉJA et al., 2012; MØLLER-KRISTENSEN et al., 2007), MASP-2 pode sofrer auto-ativação (GÁL et al., 2005). MASP-2 é 1000 vezes mais ativa

cataliticamente que C1s, e é inibida 50 vezes mais rapidamente pelo inibidor de C1 (C1inh) quando comparada com C1s (KERR et al., 2008). Além disso, MASP-2 tem atividade tipo fator Xa, estando envolvida na cascata de coagulação através de clivagem da protrombina, gerando uma rede de fibrina, covalentemente ligada à superfície bacteriana (GULLA et al., 2010).

Um dos transcritos do gene *MASP2*, obtido por processamento alternativo do pré-mRNA, codifica uma proteína plasmática de 19 kDa, chamada MAp19 (STOVER et al., 1999) ou pequena proteína associada a MBL (sMAP), (TAKAHASHI et al., 1999). O exon 5 é exclusivo para a MAp19 devido ao splicing alternativo e a poliadenilação do transcrito primário. Ele codifica o quarto aminoácido C-terminal de MAp19, não encontrado na MASP-2 (BOLDT et al., 2012). A função da MAp19 não é completamente conhecida, mas especula-se que por sua habilidade em ligar-se a MBL e ficolinas, esta compete com as MASPs para prevenir a ativação da via das lectinas (YONGQING et al., 2012).

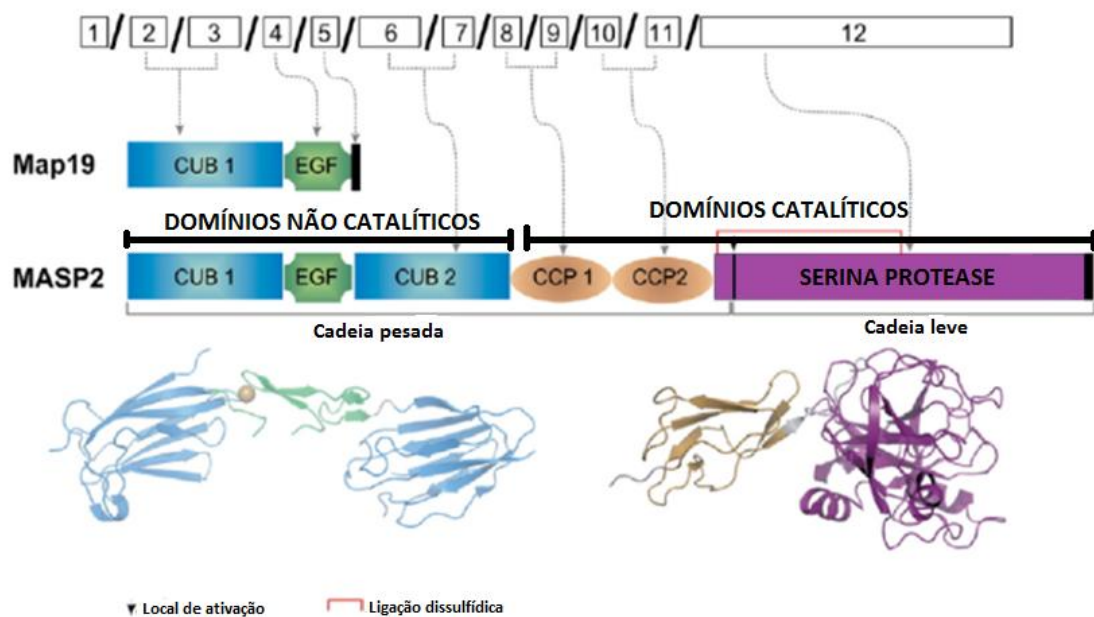


FIGURA 10 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS.

NOTA: Exons em caixas incolores. Domínios em formas geométricas coloridas.

LEGENDA: CUB: C1r/C1s, Uegf e proteína óssea morfogênica; EGF: fator de crescimento epidérmico; CCP: proteína de controle do complemento.

FONTE: BOLDT et al., 2012.

Vários polimorfismos do gene *MASP2* foram descritos em diferentes populações, dentre os quais se destacam: p.R99Q, p.R118C, p.D120G, p.P126L, p.H155R, p.156_159dupCHNH, p.D371Y, p.V377A, e p.R439H (THIEL et al., 2009).

Neste trabalho utilizamos a nomenclatura filogenética para os haplótipos formados a partir dos SNPs estudados. Esta nomenclatura foi sugerida a partir de dois clados, cada um com 5 haplótipos que surgiram da sequência hipotética mais antiga *CRDPCDVRC* (Figura 11). O clado *1 é representado por *CRDPCDVRC* e todos os outros haplótipos com *g.1965475C* no exon 12. O clado *2 é representado por *CRDPCDVRT* e os outros quatro haplótipos com *g.1965475T*. O clado *1B tem o *g.1961795T* do intron 9 em comum. Estas variantes do clado *1B foram associadas a concentrações séricas elevadas de MASP-2. O clado *1C é representado por dois haplótipos associados com baixas concentrações de MASP-2, apresentando *p.126L* associado a *p.439R* ou *p.439H*. Os haplótipos do clado *2A compartilham as variantes *p.371D* e *g.1965475T* no exon 12. A variante *p.377A* ocorre nesse contexto e está associada com baixas concentrações de MASP-2 (haplótipo *2A2-I). Os haplótipos do clado *2B tem a variante *p.371Y* em comum. O haplótipo *2B1 tem a variante *g.1945560C* do promotor, enquanto que os haplótipos *2B2 compartilham a variante *g.1945560A*, com o alelo *p.120G* (*2B2B-I) (BOLDT et al., 2011).

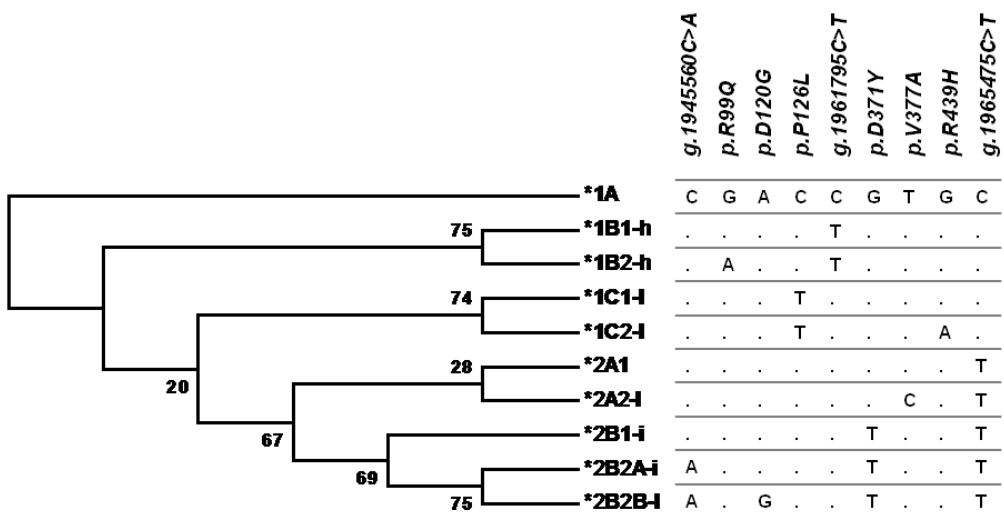


FIGURA 11. NOMENCLATURA FILOGENÉTICA DOS HAPLÓTIPOS DO GENE *MASP2*

NOTA: Árvore de máxima parcimônia dos haplótipos de *MASP2* com mudanças de nucleotídeos e nomenclatura filogenética. As posições correspondentes aos SNPs são ilustradas (GenBank: NT_021937.18, CAB50735). FONTE: BOLDT et al., 2011.

4.2.4 Polimorfismos de *MASP2* e associação com doenças

Em 2003 foi descrita pela primeira vez a deficiência genética de MASP-2, num paciente adulto com graves infecções recorrentes por *Streptococcus pneumoniae* e doença inflamatória crônica (STENGAARD-PEDERSEN et al., 2003). Nesse paciente, ambas as cópias do gene *MASP2* apresentavam uma mutação no exon 3, que codifica para o domínio CUB1, causando a substituição de glicina por ácido aspártico na posição 120 (p.D120G, c359A>G). Em estado homozigoto não há ligação de Ca^{+2} no domínio CUB1 (WEISS; MADSEN; GARRED, 2007), resultando na formação de uma proteína não funcional em níveis baixos circulantes. O alelo correspondente ocorre, em homozigose, em aproximadamente 0,15-0,3% de indivíduos euro-descendentes (STENGAARD-PEDERSEN et al., 2003; THIEL et al., 2007; VALLÈS et al., 2009).

A partir desses estudos, houve interesse para análise do polimorfismo de *MASP2* em doenças infecciosas e/ou inflamatórias. Vários outros polimorfismos do gene *MASP2*, como p.R99Q, p.R118C, p.P126L, p.H155R, p.156_159dupCHNH, p.D371Y, p.V377A e p.R439H, foram descritos em diferentes populações. A duplicação 156_159dupCHNH causa retenção citoplasmática e consequente deficiência da proteína. Esta mutação só foi encontrada em asiáticos heterozigotos, sendo a frequência esperada de homozigotos, muito menor que a de p.120G (em torno de 0,001%). Interessantemente, tanto p.120G, quanto p.156_159CHNHdup, causam a deformação da proteína, tornando-a incapaz de associar-se a MBL, já p.R439H afeta a atividade enzimática (THIEL et al., 2007, 2009). Entre afro-descendentes, substituições frequentes no primeiro domínio CUB (causada por p.126L), no segundo domínio CCP (causada por p.377A) e no domínio serina protease (causada por p.R439H) reduzem as concentrações de MASP-2 em heterozigotos (< 200 ng/ml). Homozigotos para p.439H produzem uma proteína capaz de se ligar a MBL, porém sem capacidade de ativação do complemento, e ocorrem com frequência aproximada de 2,6% (THIEL et al., 2007, 2009; BOLDT et al., 2011).

No entanto, nenhuma associação entre o polimorfismo p.D120G e FR (SCHAFRANSKI et al., 2008 RAMASAWMY et al., 2008) e outras doenças, tais como fibrose cística (OLESEN et al., 2006), pneumonia (GARCÍA-LAORDEN et al.,

2006), doenças dermatológicas (MILLER et al., 2010), câncer colorretal (YTTING et al., 2011), tumor benigno de ovário (SWIERZKO et al., 2014), carcinoma hepatocelular (SEGAT et al., 2008). Já indivíduos transplantados com fígado de doadores homozigotos para a variante p.371D apresentaram aumento de infecções bacterianas (DE ROOIJ et al., 2010). Estudos recentes relataram associação entre a variante p.371D e risco aumentado de cardiomiopatia em pacientes com doença de Chagas (BOLDT et al., 2011) e a suscetibilidade à infecção pelo vírus da hepatite C (TULIO et al., 2011). Além disso, observou-se associação entre a variante p.126L e baixas concentrações de MASP-2, com a suscetibilidade à hanseníase (BOLDT et al., 2013).

4.3 COMPLEMENTO E FEBRE REUMÁTICA

Em 1960, pesquisadores estudaram necropsias de tecido cardíaco de pacientes com FR e encontraram depósitos maciços de imunoglobulinas e complemento (KAPLAN; DALLENBACH, 1961). Em outro estudo foi demonstrado que anticorpos contra a proteína M, quando em contato com a cartilagem articular, ativavam mais complemento que soro de controles normais (BAIRD et al., 1991). Mais de uma década depois, Sapru et al. encontraram concentrações séricas diminuídas de C3 e CH50 em CRC concluindo que a CRC seria uma lesão mediada por complemento (SAPRU et al., 1977). Em outro estudo foi observado também uma redução nas concentrações de C3 com aumento de linfócitos B, complexos IgG circulantes e produtos de degradação de C3 (C3d) em pacientes FR e CRC, quando comparados com controles (REDDY et al., 1990). Anticorpos contra proteínas da sintase hialuronato estreptocócica ligam-se a fibroblastos humanos e causam lise celular mediada por complemento nos pacientes com FR (PREHM et al., 1995). Ainda, Adderson et al. demonstraram anticorpos anti-miosina fortemente reativos com N-acetil-beta-D-glucosamina, epítipo dominante do carboidrato estreptocócico, o qual reage com peptídeos da molécula de miosina cardíaca humana. Entre eles, o anticorpo monoclonal 1.H9 foi moderadamente citotóxico em células cardíacas de ratos *in vitro* na presença de complemento (ADDERSON et al., 1998).

Um papel fundamental da opsonofagocitose mediada por complemento na destruição do EGA foi demonstrado por diferentes estudos (BERENDS et al., 2013; HAAPASALO et al., 2012; REUTER et al., 2010; TSAO et al., 2013). No entanto, o EGA apresenta diversas proteínas que interferem na ativação do complemento, incluindo proteínas que degradam IgG, C5a peptidase e inibidor estreptocócico do complemento (SIC) (GUSTAFSSON et al., 2013).

Evidências indicam que o complemento causa injúria tecidual durante a resposta inflamatória que segue a cardite reumática. Anticorpos humanos e de coelho específicos para a proteína M estreptocócica, por exemplo, ligam-se a cartilagem articular e ativam significativamente o complemento (BAIRD et al., 1991).

Messias et al. evidenciaram que pacientes com CRC apresentaram uma frequência aumentada do alelo raro do componente C4, C4A*6 quando comparados a controles, enquanto que o alelo C4A*3 foi associado com proteção a CRC, sugerindo um papel imunogenético do complemento na doença (DE MESSIAS; CAVALCANTI; RADOMINSKI, 1995).

4.4 VIA DAS LECTINAS E FEBRE REUMÁTICA

Em 2000, pesquisadores demonstraram que a MBL liga-se fortemente à N-acetil- β D-glucosamina na parede do estreptococo promovendo deposição do complemento. Os autores concluíram que a MBL é importante na primeira linha de defesa imune contra diversos patógenos (NETH et al., 2000). Em 2004, outro grupo de pesquisadores investigaram a ligação da ficolina 2 em bactérias gram positivas, incluindo o EGA, e descobriram que a ficolina 2 liga-se ao ácido lipoteicóico, que é um constituinte da parede celular das bactérias gram positivas, ativando o complemento pela via das lectinas (LYNCH et al., 2004).

O papel da deficiência de MBL na susceptibilidade a FR e CRC é controverso. Em 2001, um grupo estudando principalmente as mutações do exon 1 do gene *MBL2*, encontraram que os sintomas cardíacos iniciaram sete anos antes (média 30 anos) em pacientes chineses com CRC com o alelo B, do que nos homozigotos A/A (média 37 anos). Isto os levou a sugerir que a deficiência de MBL poderia facilitar o desenvolvimento de CRC em pacientes jovens (JIN; JI; HU, 2001). Corroborando este achado, outro estudo com pacientes CRC no Yemen, relataram

concentrações de MBL mais baixas nos pacientes comparados a controles saudáveis (SCALZI et al., 2010). Em contraste, pacientes CRC brasileiros apresentaram concentrações mais altas de MBL, do que controles saudáveis, os quais apresentaram também alta frequência de deficiência de MBL (SCHAFRANSKI et al., 2004). O mesmo grupo de pacientes apresentou uma alta frequência do genótipo *MBL2**A/A, o qual está associado com altas concentrações de MBL em pacientes CRC comparados a controles com o mesmo genótipo. Especificamente, os genótipos *MBL2* observados com alta frequência em pacientes CRC foram *HYPA/HYPA*, *HYPA/LYQA* e *LYQA/LYQA*. Por outro lado, a frequência do alelo variante *MBL2**O, assim como genótipos O/O, foram mais baixas entre os pacientes (MESSIAS REASON et al., 2006). Em 2008 Schafranski et al. confirmaram estes achados, demonstrando que concentrações de MBL > 2800 ng/mL aumentaram o risco de CRC. Além disso, genótipos associados com alta produção de MBL (YA/YA e YA/XA) foram mais frequentes em pacientes CRC e pacientes FR sem acometimento cardíaco (SCHAFRANSKI et al., 2008b). Esses estudos sugeriram que a insuficiência de MBL poderia proteger contra FR, reduzindo a ativação do complemento e inflamação (MESSIAS REASON et al., 2006). Por outro lado, a deficiência de MBL foi associada à regurgitação aórtica severa crônica de etiologia reumática, sendo que a frequência do alelo *D* e dos homozigotos O/O foi maior entre pacientes do que em controles (RAMASAWMY et al., 2008)

Em 2009, Messias-Reason et al. investigou polimorfismos na região promotora do gene *FCN2* (posições -986, -602 e -4) em pacientes com FR, CRC e controles. O haplótipo -986G -602G -4A (GGA), o qual é associado com baixas concentrações de ficolina 2, foi mais frequente em pacientes CRC do que em controles. Os haplótipos AGA e AGG foram mais frequentes no grupo controle, quando comparado com os pacientes (FR + CRC). Portanto *FCN2**GGA, haplótipo promotor associado com baixas concentrações de ficolina 2, parece aumentar a susceptibilidade a FR e CRC, enquanto AGG e AGA, associados com concentrações intermediárias de ficolina 2, parecem ter um papel protetor contra o desenvolvimento de CRC (MESSIAS-REASON et al., 2009).

Em 2008, Schafranski et al investigaram o polimorfismo D120G do gene *MASP2* em pacientes RF e CRC. Não foi encontrada diferença significativa na frequência do alelo mutante D entre pacientes e controles, sugerindo que o polimorfismo

D120G não desempenha um papel relevante na patogênese da FR (SCHAFRANSKI et al., 2008a). Estes achados foram confirmados posteriormente em outro estudo envolvendo pacientes CRC e controles (RAMASAWMY et al., 2008). Mas em ambos os estudos não foi encontrado pacientes homozigotos D/D, provavelmente devido ao tamanho amostral e baixa frequência desta mutação.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

A utilização de amostras de sangue humano foi autorizada pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do HC/UFPR sob número de registro 2658.265/2011-11 (Anexo 1). Segundo informações prévias do CEP, no caso de pesquisa em amostras já estocadas, ficou dispensado o termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes estudados.

Este é um estudo tipo caso-controle, analítico e retrospectivo, realizado no laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas/UFPR, durante os anos de 2004 à 2008.

5.1 CASUÍSTICA

5.1.1 Pacientes

Fazem parte deste estudo materiais biológicos retrospectivos pertencentes à soroteca e ao banco de DNA do laboratório de Imunopatologia Molecular do HC-UFPR. Foram incluídos 145 pacientes com história de FR, sendo 43 (30%) homens e 102 (70%) mulheres, com mediana de idade de 39 anos (intervalo de 7 a 76 anos). De acordo com a classificação étnica (realizada pelo pesquisador), 111 (76%) indivíduos são euro-brasileiros e 34 (24%), afro-brasileiros. Todos os pacientes tinham história de FR pregressa de acordo com os critérios de Jones modificados (1992). Critérios de exclusão: outras doenças inflamatórias, neoplasias, endocardite infecciosa ou outras infecções, no momento da coleta do material. Dentre os pacientes investigados, 103 (70,34%) eram portadores de CRC, cujo diagnóstico foi obtido através de história clínica e ecocardiograma transtorácico, mostrando o comprometimento reumático da válvula mitral. Os outros 42 pacientes (28,96%) não evoluíram para CRC, sendo que 35 (23,48%) apresentaram história de cardite reumática aguda (CRA) e 7 (4,69%) não apresentaram esse sintoma como manifestação da FR. Dos 42 pacientes sem CRC, 19 (45,2%) tinham história de artrite, 4 (9,5%) de nódulos subcutâneos, 3 (7,1%) de coreia e 1 (2,3%) de eritema marginado (SCHAFRANSKI, 2008).

5.1.2 Controles

Todo o material biológico do grupo controle também é retrospectivo, pertencendo à soroteca e ao banco de DNA do laboratório de Imunopatologia Molecular do HC-UFPR. O grupo controle compõe-se de 290 doadores de sangue procedentes do Banco de sangue do Hospital de Clínicas da UFPR e do Centro de Hematoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR), sendo 86 homens (30%) e 204 mulheres (70%), com mediana de idade de 38 anos. Destes, 222 são euro-brasileiros (76,5%) e 68 (23,5%) afro-brasileiros. Os controles foram pareados por sexo, idade e grupo étnico com os pacientes incluídos na investigação.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído do sangue total a partir da alíquota de camada leuco-plaquetária utilizando-se o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, Wiscosin – Estados Unidos). O procedimento foi realizado conforme instruções do fabricante, seguindo as etapas de lise dos eritrócitos, lise nuclear dos linfócitos, precipitação de proteínas, precipitação e reidratação do DNA.

Em um tubo de microcentrífuga com capacidade para 1,5 µL, adicionou-se 150 µL de buffy coat proveniente de 5 mL de sangue coletado com EDTA e 600 µL de *Cell Lysis Solution*. Após homogeneização adicionou-se 12µL de proteinase K e o tubo foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 13.792 G por 2 minutos. O sobrenadante foi removido. Foi adicionado 300 µL de *Nuclei Lysis Solution* no tubo que continha as células re-suspensas, a solução foi homogeneizada e incubada a 37°C em banho seco por 5 minutos. Foi adicionado 1,5 µL de *RNase solution* na parede do tubo e adicionado 100 µL de *Protein Precipitation Solution* ao lisado nuclear e foi incubado a 37°C por 5 minutos. O tubo foi agitado vigorosamente no agitador Vortex seguido de centrifugação a 13.792 G por 3 minutos a temperatura ambiente. Um sedimento de proteína marrom

escuro pode então ser visto. O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 µL, limpo, previamente preenchido com 300 µL de isopropanol gelado. A solução foi homogeneizada suavemente até que se formassem fios de DNA visíveis. Foi centrifugada a 13.792 G durante 3 minutos. O DNA se torna visível como uma pequena massa no fundo do microtubo. O sobrenadante foi descartado e adicionado etanol 70% a temperatura ambiente. Homogeinizado e centrifugado a 13.792 G por 3 minutos. O etanol foi descartado e o tubo foi invertido sobre papel absorvente até a evaporação total do etanol. Adicionado 50 µL de *DNA Rehydration Solution* para re-hidratar o DNA. O DNA extraído foi incubado 12 horas a 4°C e após a -20°C.

5.2.2 Reação em cadeia da polimerase sequência específica (PCR-SSP)

A PCR baseia-se na amplificação *in vitro* de regiões específicas de DNA e consiste em sucessivos ciclos de desnaturação da dupla fita, hibridação com oligonucleotídeos e extensão da cadeia de DNA por meio da ação da enzima *Taq* polimerase (SAIKI et al., 1988). Na PCR-SSP, os iniciadores (ou primers), os quais consistem de 18 a 22 nucleotídeos, são projetados de forma que o último nucleotídeo (a 5') seja complementar aos nucleotídeos variantes de interesse da fita-molde.

A tipagem SSP baseia-se na premissa de que, se não houver complementaridade perfeita entre o último nucleotídeo do iniciador e a fita-molde, não há amplificação da sequência desejada, o que permite a tipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene candidato *MASP2* na população estudada. Além disso, os iniciadores da PCR-SSP também devem ser compatíveis com um par de iniciadores genéricos que amplificam o controle endógeno da reação, que caracteriza o controle positivo.

A PCR-SSP pode ser dividida em simples ou multiplex, sendo que ambas podem ser classificadas como uniespecífica ou biespecífica. A estratégia de PCR-SSP convencional permite a tipagem dos SNPs da região estudada em duas reações por amostra. Já a PCR-SSP multiplex é capaz de amplificar simultaneamente vários fragmentos de DNA, em geral mais de dois.

5.2.3 PCR-SSP do gene *MASP2*

As tipagens foram realizadas através da PCR-SSP multiplex e biespecífica, capaz de amplificar simultaneamente vários fragmentos de DNA, de forma a economizar DNA genômico, tempo, material e reagentes. A PCR-SSP multiplex para o gene *MASP2* permite a genotipagem simultânea de até 6 SNPs em apenas 4 reações por amostra, utilizando a combinação de 6 pares de iniciadores específicos (BOLDT et al., 2011).

No presente estudo, utilizaram-se iniciadores específicos (Tabela 5) para os seguintes SNPs do gene *MASP2* (Figura 12):

rs7548659 (situado no promotor, *g.4847A>C*)
rs61735600 (exon 3, *g.5557G>A*, p.R99Q)
rs72550870 (exon 3, *g.5620A>G*, p.D120G)
rs56392418 (exon 3, *g.5638C>T*, p.P126L)
rs2273344 (Intron 4, *g.7164A>G*)
rs9430347 (Intron 5, *g.74441G>A*)
rs17409276 (Intron 9, *g.21081C>T*)
rs12711521 (Exon 10, *g.21370G>T*, p.Y371D)
rs2273346 (Exon 10, *g.21389T>C*, p.V377A)
rs12085877 (Exon 12, *g.24599G>A*, p.R439H)
rs1782455 (Exon 12, *g.24762T>C*, p.S493=)

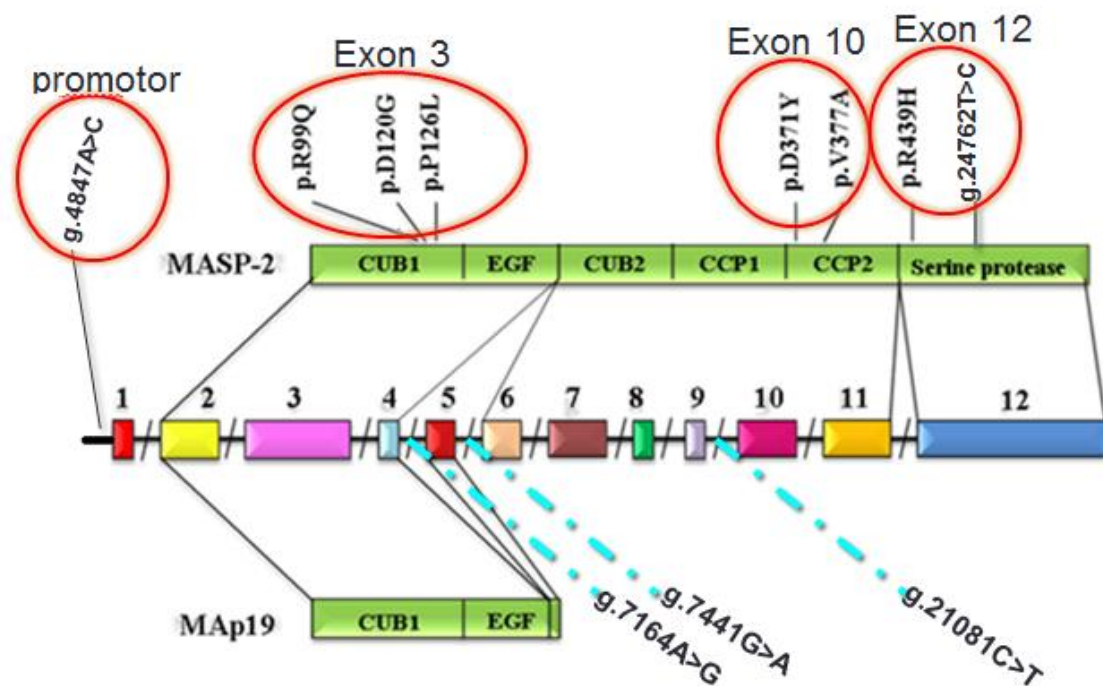


FIGURA 12. GENE *MASP2* E OS SNPs PESQUISADOS.

NOTA: todos os SNPs pesquisados no presente estudo com sua localização no gene e na proteína MASP-2. FONTE: BOLDT et al, 2012 modificado.

Os onze SNPs foram identificados por meio de sete fragmentos específicos, amplificados em quatro diferentes reações: Multiplex 1, Multiplex 2, SSP *p.D120G* e SSP Intron 4,5 (Figura 13). Na Multiplex 1 e na SSP Intron 4,5 foram coamplificados fragmentos específicos de dois genes não analisados no presente trabalho: um fragmento na região promotora da *FCN1* e um fragmento da região promotora da *FCN2*.

TABELA 5. INICIADORES SSP UTILIZADOS

Identificação SNP	Iniciador	Sequência 5' – 3'
<i>MASP2</i>		
rs7548659	MASP2 Prom_-175Cf	5' TCCGACTCCTGGCTCCC 3'
	MASP2 Prom_-175Af	5' GTCCGACTCCTGGCTCCA 3'
rs61735600	MASP2 Ex3_99Rf	5' GAGCACAGACACGGAGCG 3'
	MASP2 Ex3_99Qf	5' AGAGCACAGACACGGAGCA 3'
rs72550870	MASP2 Ex3_120Dr	5' GCTTCTCGTTGGAGTAGT 3'
	MASP2 Ex3_120Gr	5' GCTTCTCGTTGGAGTAGC 3'
rs56392418	MASP2 Ex3_126Pr	5' CCTCGAACCCCGTGAACG 3'
	MASP2 Ex3_126Lr	5' GCCTCGAACCCCGTGAACA 3'
	MASP2 Promf	5'CAGGTCACTGGACAAACAGATCA 3'
rs2273344	MASP2 Intr4_rs2273344Gf	5' GTTCCCTGCACTGTGGGACG 3'
	MASP2 Intr4_rs2273344Af	5' GTTCCCTGCACTGTGGGACA 3'
rs9430347	MASP2 Intr5_rs9430347Ar	5' CTCCCACCCCAGAGACACGT 3'
	MASP2 Intr5_rs9430347Gr	5' CTCCCACCCCAGAGACACGC 3'
rs17409276	MASP2 Intr9_+16060Cf	5' CAGCACACCTCTTCCTCC 3'
	MASP2 Intr9_+16060Tf	5' CAGCACACCTCTTCCTCT 3'
rs12711521	MASP2 Ex10_371Yr	5' TCGGCCACTGGGTAGATA 3'
	MASP2 Ex10_371Dr	5' TCGGCCACTGGGTAGATC 3'
rs2273346	MASP2 Ex10_377Vr	5' GGACCTGTGATGTACTCCA 3'
	MASP2 Ex10_377Ar	5' GACCTGTGATGTACTCCG 3'
rs12085877	MASP2 Ex12_439Rf	5' TGTGGACTATCAGCCCCG 3'
	MASP2 Ex12_439Hf	5' TGTGGACTATCAGCCCA 3'
rs1782455	MASP2 Ex12_S493Cr	5' ATTCGAATGTCCAGGGCG 3'
	MASP2 Ex12_S493Tr	5' ATTCGAATGTCCAGGGCA 3'
<i>FCN1</i>		
rs2989727	FCN1 Prom_-1981Gf	5' CCCATGAGCCTGGTTATCG 3'
	FCN1 Prom_-1981Af	5' CCCATGAGCCTGGTTATCA 3'
	FCN1 Promr	5' ACCTCCTCTTCCTTGCAACA 3'
<i>FCN2</i>		
rs3124952	FCN2 Prom -986Af	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCA 3'
	FCN2 Prom -986Gf	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCG 3'
rs17514136	FCN2 Prom -4Ar	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCT 3'
	FCN2 Prom -4Gr	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCC 3'
Controles da reação	HGHf	5' TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3'
	HGHr	5' CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC 3'
	MBL2 Promf	5' ATGGGGCTAGGCTGCTGAG 3'
	MBL2 Ex1r	5' CCAACACGTACCTGGTTCCC 3'
	FCN2 Ex8f	5' GCCAGGCCTCAGGTATAAAG 3'
	FCN2 Ex8r	5' AAAGGGTTGATTGCGGAAAC 3'

NOTA: A nomenclatura adotada para os iniciadores é como segue: [nome do gene] [região de complementaridade (Prom Promotor, In Intron, Ex Exon)]_[localização de acordo com o sítio de início da transcrição ou número de códon ou número rs][nucleotídeo, aminoácido ou nome comum da variante][f direto r reverso]. Em negrito: nucleotídeo variante.

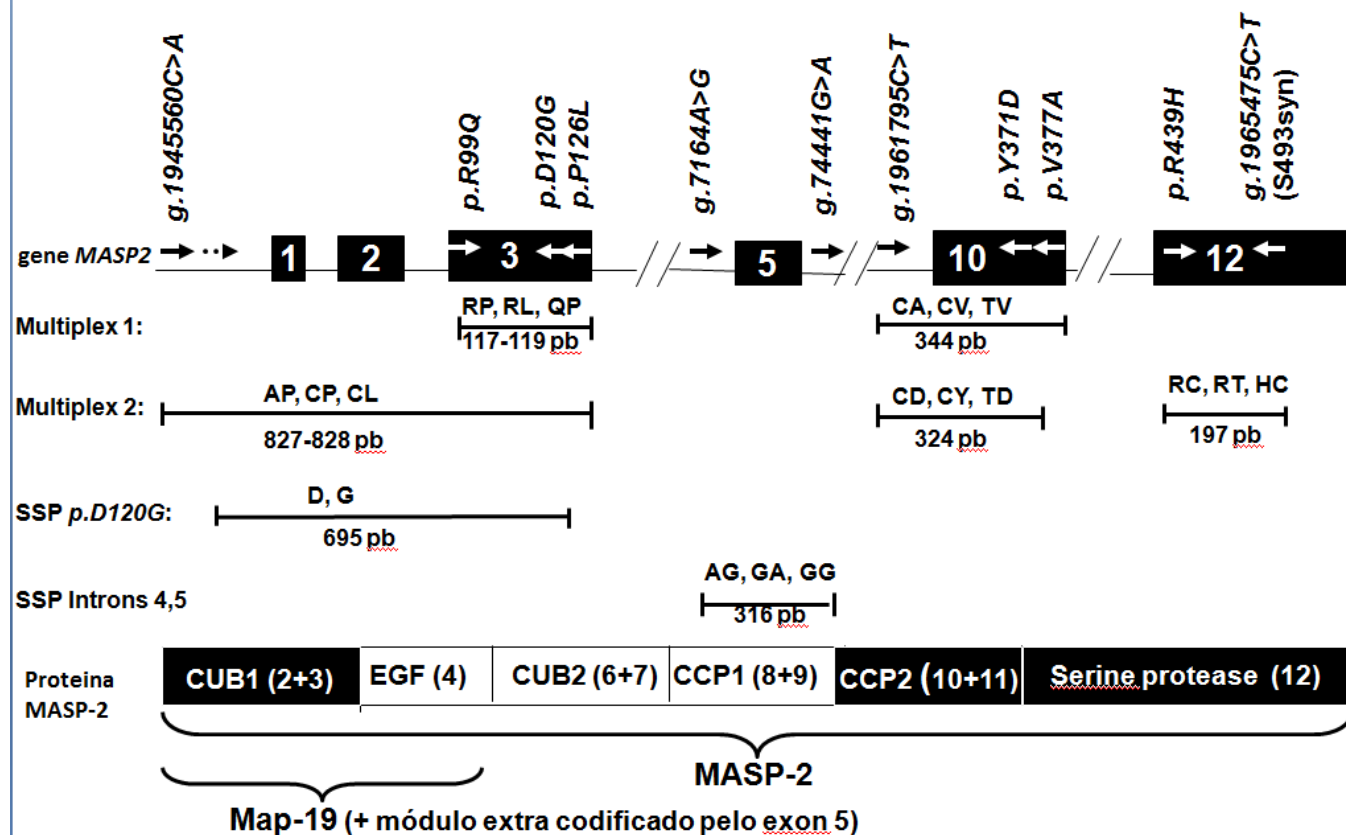


FIGURA 13. FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR-SSP E SUA RELAÇÃO COM O GENE E A PROTEÍNA MASP-2

NOTA: No gene *MASP2* os exons estão numerados em caixas pretas. Os SNPs pesquisados estão acima do gene. Abaixo os fragmento gerados em cada PCR e a proteína MASP-2 com seus domínios. FONTE: BOLDT et al, 2011 modificado.

As PCRs foram realizadas a partir de 20 a 100 ng de DNA genômico e 0,1 a 0,3 μ M de cada iniciador específico na presença de 1,5 a 2,0 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM e 0,5 a 2 unidades de Taq polimerase. A PCR é realizada em 30 ciclos, cada ciclo iniciando com 94°C por 20 segundos e terminando com 72°C por 30 segundos. A temperatura de acoplamento dos iniciadores é alta nos 10 primeiros ciclos, intermediária nos 10 seguintes e baixa nos 10 últimos ciclos (estratégia touch-down), garantindo alta especificidade para a amplificação e grande quantidade de produto (Tabela 6). Cada PCR é acompanhada por controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA, e controles positivos compostos de DNA sabidamente positivos ou negativos para os genótipos estudados.

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato 0,09M e EDTA 0,002M, pH 8,0), corado com Sybrsafe (Invitrogen), o qual é fluorescente sob luz azul. Foram utilizados nas corridas eletroforéticas, juntamente com as amostras, controle positivo e negativo e um marcador de peso molecular de 100 pb (Figura 14).

A genotipagem é rápida e baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados, permitindo rápida resolução haplotípica (Tabela 7). A PCR multiplex utilizada foi descrita previamente nos estudos do laboratório de Imunopatologia molecular (BOLDT *et al.*, 2011, 2013).

TABELA 6. CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

	Multiplex PCR-SSP 1			Multiplex PCR-SSP 2				SSP <i>p.D120G</i>		SSP Introns 4,5		
Temperatura de anelamento												
(cada 10 ciclos)	60-56-52°C			62-58-54°C				58-57-56°C		70-68-66		
Tamanho dos fragmentos	729, (500), 344, 117-119 pb			827-828, (500), 324, 197 pb				(1059), 695 pb		1022, 431, 316 pb		
Concentração de MgCl ₂	2.0 mM			1.8 mM				1.5 mM		1,5 mM		
Iniciadores	Misturas			Misturas				Misturas		Misturas		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	B4	D	G	C1	C2	C3
MASP2 Prom_-175Af				X	X							
MASP2 Prom_-175Cf						X	X					
MASP2 Ex3_126Pr	X		X	X		X						
MASP2 Ex3_126Lr		X			X		X					
MASP2 Ex3_99Rf	X	X										
MASP2 Ex3_99Qf			X									
MASP2 Promf								X	X			
MASP2 Ex3_120Dr								X				
MASP2 Ex3_120Gr									X			
MASP2 In4_Gf											X	X
MASP2 In4_Af										X		
MASP2 In5 Ar											X	
MASP2 In5 Gr										X		X
MASP2 In9_+16060Cf	X	X		X	X							
MASP2 In9_+16060Tf			X			X	X					
MASP2 Ex10_377Vr		X	X									

Continua

Continuação da Tabela 6

	A1	A2	A3	B1	B2	B3	B4	D	G	C1	C2	C3
MASP2 Ex10_377Ar	X											
MASP2 Ex10_371Yr					X		X					
MASP2 Ex10_371Dr				X		X						
MASP2 Ex12_439Rf					X		X					
MASP2 Ex12_439Hf				X		X						
MASP2 Ex12_S493Cr				X			X					
MASP2 Ex12_S493Tr					X	X						
FCN1 Prom_-1981Af		X	(X)									
FCN1 Prom_-1981Gf	X											
FCN1 Promr	X	X	(X)									
FCN2 Prom_-986 Af										(X)	(X)	
FCN2 Prom_-986 Gf												(X)
FCN2 Prom_-4 Ar										(X)		(X)
FCN2 Prom_-4 Gr											(X)	
<i>FCN2 Ex8r^a</i>	X	X	X	X	X	X	X					
<i>FCN2 Ex8r^a</i>	X	X	X	X	X	X	X					
<i>MBLPromf^b</i>								X	X			
<i>MBLrev+270^b</i>								X	X			

NOTA: Cada mistura de iniciadores amplifica variantes diferentes. Por exemplo, A1 pode amplificar 3 fragmentos específicos: o fragmento de controle endógeno (exon 8 de *FCN2*) de aproximadamente 500 pb, o fragmento de 729 pb com o alelo “G” (rs2989727) no promotor de *FCN1*, o fragmento de 344 pb correspondendo ao haplótipo CA (com *g.1961795C* no intron 9 e com *p.377A* no exon 10) e o fragmento de 117 pb correspondendo ao haplótipo RP (com *p.99R* e *p.126P*). Entre parênteses: opcional. Em itálico: iniciadores controles. Previamente publicado: ^a: (MESSIAS-REASON et al., 2009) ^b: (BOLDT et al., 2006).

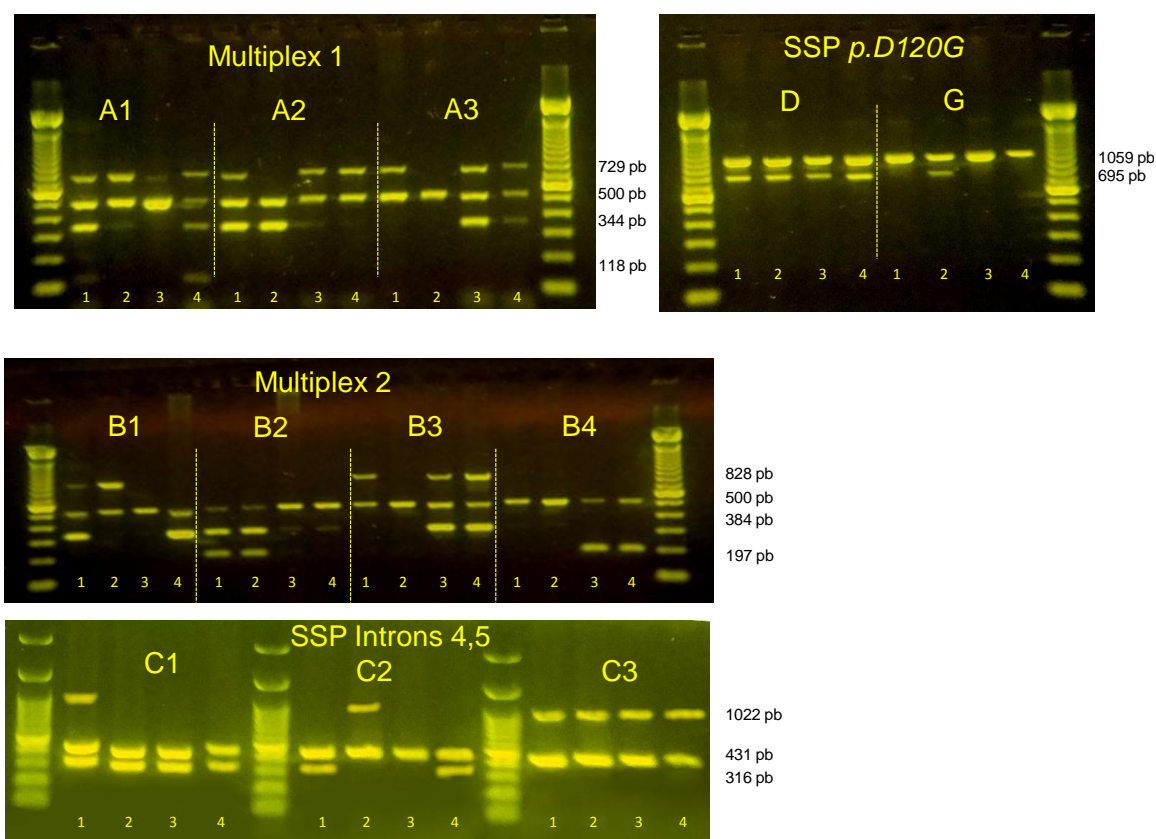


FIGURA 14. PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS PCRs REALIZADAS PARA O GENE MASP2

NOTA: Quatro amostras foram tipadas com cada mistura de primers e os produtos aplicados nos respectivos géis, ladeados por um marcador de peso molecular de 100 pb. Tamanho dos produtos amplificados é dado à direita de cada figura. Interpretação dos genótipos e haplótipos estão na tabela abaixo.

FONTE: o autor.

TABELA 7. INTERPRETAÇÃO DAS AMOSTRAS DA FIGURA 14

Multiplex 1	SNPs	pb	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
	<i>FCN1</i> rs2989727	729	A/G	G/G	A/A	A/G
	<i>g.1961795C>T, p.V377A</i>	344	CA/CV	CV/CV	TV/TV	CA/TV
	<i>p.R99Q, p.P126L</i>	117-119	RP/RP	*	*	RP/RP

Continua

Continuação da tabela 7						
	SNPs	pb	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Multiplex 2	<i>g.1945560C>A,</i> <i>p.P126L</i>	827-828	<i>AP/CP</i>	<i>AP/AP</i>	<i>CP/CP</i>	<i>CP/CP</i>
	<i>g.1961795C>T,</i> <i>p.Y371D</i>	324	<i>CD/CY</i>	<i>CY/CY</i>	<i>TD/TD</i>	<i>CD/TD</i>
	<i>p.R439H,</i> <i>g.1965475C>T</i>	197	<i>RT/RT</i>	<i>RT/RT</i>	<i>RC/RC</i>	<i>RC/RT</i>
SSP <i>p.D120G</i>	<i>p.D120G</i>	695	<i>D/D</i>	<i>D/G</i>	<i>D/D</i>	<i>D/D</i>
SSP Introns 4,5	<i>MASP2 Intron 4,5</i>	316	<i>AG/GA</i>	<i>AG/AG</i>	<i>AG/AG</i>	<i>AG/GA</i>
	<i>FCN2Prom 1,3</i>	1022	<i>AA/GA</i>	<i>AG/GA</i>	<i>GA/GA</i>	<i>GA/GA</i>

NOTA: SSPs para p.R99Q foram excluídas da mistura de primers para as amostras 3 e 4 para mostrar a flexibilidade da reação. Os haplótipos de *MASP2* dos indivíduos representados pelas diferentes amostras estão listados a seguir:

Amostra 1 - *ARDPAGCYVRT/CRDPGACDVRT*,

Amostra 2 - *ARGPAGCYVRT/ARDPAGCYVRT*,

Amostra 3 - *CRDPAGTDVRC/CRDPAGTDVRC*,

Amostra 4 - *CRDPAGCDVRT/CRDPGATDVRC*.

FONTE: o autor.

5.2.4 Quantificação de MASP-2

A concentração plasmática de MASP-2 foi avaliada nos 145 pacientes e em 145 controles, por meio do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) utilizando o kit comercial HK326 (*Hycult Biotechnology, Uden, Países Baixos*), seguindo-se as instruções do fabricante. Este kit permite detectar 1,6-100 ng/ml MASP-2, no plasma e/ou soro.

As amostras foram diluídas 1:40 em tampão de diluição fornecido pelo fabricante, em seguida foram aplicadas 100 µL de amostras e padrões nos poços de poliestireno sensibilizados com anticorpo anti- MASP-2. Procedeu-se a incubação por 60min a 25°C. Em seguida a placa foi lavada 5x utilizando-se 200 µL/poço de tampão de lavagem. Foi adicionado 100 µL de solução *tracer* (anticorpo biotilado anti-MASP-2) em cada poço e a placa foi incubada por uma hora à 25°C. Em seguida a lavagem foi repetida por 5x. Foi aplicado 100 µL de solução estreptavidina

peroxidase em cada poço e a placa foi incubada por 60 min à 25°C. A placa foi lavada novamente 5x e adicionado 100 µL/poço de substrato para a peroxidase tetrametilbenzidina (TBM). A placa foi incubada por 30min, no escuro, à 25°C. A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de solução de ácido oxálico. Foi realizada a leitura a 450nm no equipamento *BioTek Elx800*. As concentrações de MASP-2 foram calculadas a partir da curva gerada pelos padrões de concentração conhecida, fornecidas pelo fabricante e aplicadas concomitantemente com as amostras.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genótípicas foram determinadas através de contagem direta. O conhecimento de fase entre os alelos é dado pela amplificação biespecífica com iniciadores SSP. A fase entre alelos mais distantes foi inferida devido ao desequilíbrio de ligação entre as variantes. Esta estratégia foi previamente confirmada com o uso de algoritmos de máxima verossimilhança (BOLDT et al., 2013). As hipóteses de equilíbrio de Hardy e Weinberg e de homogeneidade entre a distribuição de genótipos e haplótipos dos grupos investigados foram avaliadas utilizando-se os testes exatos propostos por Guo e Thompson (1992) e Raymond e Rousset (1996), no pacote de programas *ARLEQUIN* v.3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Para as análises de associação, foi realizado o teste exato de Fisher bicaudal e regressão logística binária, com o software *STATA* v.9.2. Quando apropriado, foi calculado o odds ratio, com intervalo de confiança de 95%. A estatística descritiva em relação às concentrações de MASP-2 circulante foi apresentada em mediana e percentis. A distribuição dos dados foi avaliada com o teste Shapiro-Wilk para conformidade com a distribuição normal. Na ausência de normalidade, as medianas foram comparadas através dos testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, utilizando-se o software “*GraphPad Prism* – versão 5.0”. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES

Dentre os pacientes com CRC, houve um número inferior de indivíduos do sexo masculino, comparado com o feminino. Neste grupo, o número de afro-brasileiros também foi inferior ao de euro-brasileiros. Já a distribuição sexual e de ascendência euro- ou afro-brasileira entre os pacientes com FRO foi homogênea. Logo, o sexo masculino e a ascendência africana estão, nesta amostra, isoladamente associados com proteção contra o agravamento da doença. Quando avaliados em conjunto por meio de regressão logística, contudo, a associação desaparece. Ao contrário, idade crescente representou um fator de susceptibilidade à CRC, uma vez que a idade média de pacientes com CRC foi cerca de duas vezes superior à idade média de pacientes com FRO. Além disso, esta associação é independente do sexo e da ascendência étnica, pois permaneceu a mesma após correção para estes fatores demográficos (Tabela 8).

Através de cálculo amostral (com erro amostral de 5% e nível de confiança de 95%) o número mínimo de pacientes para este estudo seria 35, o que é quatro vezes inferior ao n amostral do presente estudo. A determinação do poder foi calculada, sendo 0,97.

TABELA 8. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES CRC E FRO

	Pacientes FRO	Pacientes CRC	OR [IC95%]*	p*	OR [IC95%] [#]	p [#]
N	42	103				
Homens	18 (42,9%)	25 (24,3%)	0,43 [0,2-0,91]	0,028	n.s.	n.s.
Mulheres	24 (57,1%)	78 (75,7%)				
Euro-Brasileiros	25 (59,5%)	86 (83,5%)				
Afro-brasileiros	17 (40,5%)	17 (16,5%)	0,29 [0,13-0,65]	0,003	n.s.	n.s.
Idade média	21,6 ± 1,1	46,4 ± 2,3	1,71 [1,33-2,19]	<0,0001	1,72 [1,32-2,24]	< 0,0001
Idade média						
mulheres	22,3 ± 1,1	46,1 ± 2,3				
homens	20,7 ± 1,0	47,2 ± 2,4				

LEGENDA: * regressão logística binária simples; # regressão logística multivariada.

Os dados clínicos da amostra de pacientes foram previamente descritos por SCHAFRANSKI, 2008.

6.2 POLIMORFISMOS DE *MASP2*

Foram identificados onze SNPs, cuja distribuição genotípica não diferiu da esperada segundo o modelo de Hardy-Weinberg (pacientes $p=0,18$, controles $p=0,49$), sendo homogênea entre pacientes, controles e subgrupos de pacientes. Não houve associação entre um único SNP e a doença (Tabela 9). As frequências dos alelos intrônicos sabidamente associados com altas concentrações de *MASP-2* (*g.7164G*, *g.7441A* e *g.21081T*) também não diferiu entre os grupos investigados. Semelhantemente, as frequências cumulativas dos alelos que causam substituições de aminoácidos, associados a baixas concentrações de *MASP-2* (*p.120G*, *p.126L*, *p.377A* e *p.439H*) também não diferiu entre os grupos, sendo de 17/290 ou 5,9% nos pacientes (13/206 ou 6,3% nos pacientes com CRC e 4/84 ou 4,8% nos pacientes com FRo) e 46/580 ou 7,9%, nos controles. Contudo, a frequência cumulativa de dois destes alelos – *p.377A* e *p.439H* – foi mais baixa na FR. Estes SNPs foram associados com proteção contra a FR (6/290 ou 2,1% em pacientes vs. 32/580 ou 5,5% em controles, teste exato de Fisher $p=0,02$, $OR=0,36$ [$IC_{95\%}=0,15-0,88$]) e contra CRC (3/206 ou 1,5% em pacientes com CRC vs. 32/580 ou 5,5% em controles, teste exato de Fisher $p=0,02$, $OR=0,25$ [$IC_{95\%}=0,08-0,84$]). Genótipos com estes alelos também foram associados com proteção contra FR (6/145 ou 4,1% em pacientes vs. 31/290 ou 10,7% em controles, teste exato de Fisher $p=0,03$, $OR=0,36$ [$IC_{95\%}=0,15-0,89$]). Contudo, a distribuição dos SNPs investigados não diferiu entre os grupos de pacientes com CRC e FRo.

TABELA 9. FREQUÊNCIAS (%) DOS ALELOS MENOS COMUNS DE *MASP2*

dbSNP	Região gene	NG007289.1 Alelos	NP_006601.2 Aminoácido	Pacientes (N =290)	Controles (N =580)	Pacientes CRC (N=206)	Pacientes FRo (N=84)
rs7548659	Promotor	g.4847A> C	n.a.	100 (34,5)	188 (32,4)	76 (36,9)	24 (28,6)
rs61735600	Exon 3	g.5557G> A	p.R99 Q	0	5 (0,9)	0	0
rs72550870	Exon 3	g.5620A> G	p.D120 G	5 (1,7)	6 (1,0)	4 (1,9)	1 (1,2)
rs56392418	Exon 3	g.5638C> T	p.P126 L	6 (2,1)	8 (1,4)	6 (2,9)	0
rs2273344	Intron 4	g.7164A> G	n.a.	62 (21,4)	105 (18,1)	44 (21,4)	18 (21,4)
rs9430347	Intron 5	g.7441G> A	n.a.	62 (21,4)	105 (18,1)	44 (21,4)	18 (21,4)
rs17409276	Intron 9	g.21081C> T	n.a.	51 (17,6)	90 (15,5)	36 (17,5)	15 (17,9)
rs12711521	Exon 10	g.21370G> T	p.Y371 D	81 (27,9)	160 (27,6)	61 (29,6)	20 (23,8)
<u>rs2273346</u>	<u>Exon 10</u>	<u>g.21389T>C</u>	<u>p.V377A</u>	<u>6 (2,1)</u>	<u>26 (4,5)</u>	<u>3 (1,5)</u>	<u>3 (3,6)</u>
<u>rs12085877</u>	<u>Exon 12</u>	<u>g.24599G>A</u>	<u>p.R439H</u>	<u>0</u>	<u>6 (1,0)</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
rs1782455	Exon 12	g.24762T> C	p.S493=	74 (25,5)	132 (22,8)	57 (27,7)	17 (20,2)

LEGENDA: N: números de cromossomos; CRC cardiopatia reumática crônica; FRo febre reumática somente; em negrito e itálico: alelos menos comuns. n.a.: não aplicável; Sublinhado: alelos associados com proteção a FR e CRC.

Os onze SNPs identificados compõem quinze diferentes haplótipos: (*1A [AG], *1A [GA], *1B1-h [AG], *1B1-h [GA], *1B2-h [GA], *1C1-l [AG], *1C2-l [AG], *2A1 [AG], *2A2-l [AG], *2B1-i [AG], *2B1-i [GA], *2B2A-i [AG], 2B2A-i [GA], *2B2B-l [AG] e o haplótipo recombinante *2B2A-i.1B1-h [AG]). Treze destes ocorreram nos pacientes e todos os 15, nos controles. Não houve associação entre um único haplótipo e a doença (Tabela 10). O haplótipo *ARDPAGCYVRT* (*2B2A-i [AG]), sabidamente associado a concentrações intermediárias de MASP-2 no soro (entre 200 e 600 ng/ml), foi o mais frequente tanto em pacientes (62,4% - 181/290), quanto em controles (65,5% - 380/580). O haplótipo *CRDPGATDVRC* (*1B1-h [GA]),

portador de todas as variantes intrônicas sabidamente associadas com concentrações elevadas de MASP-2 (superiores a 600 ng/ml), foi o segundo mais frequente em pacientes (16,6% - 48/290) e em controles (13,1% - 76/580). Não encontramos associação entre pacientes e controles com os haplótipos mais frequentes. Foi encontrado um haplótipo recombinante, de baixa frequência: **2B2A-i.1B1-h [AG]*. Além deste, houve um haplótipo com frequência inferior a 1%, encontrado somente nos controles, portador da variante p.99Q e associado a concentrações altas de MASP-2 no soro: *CQDPGATDVRC (*1B2-h [GA])*. O haplótipo *CRDLAGCDVHC (*1C2-I [AG])* também foi encontrado somente no grupo controle. A variante p.439H é marcadora deste último haplótipo, causador de deficiência funcional de MASP-2 em homozigose. Logo, *CRDLAGCDVHC (*1C2-I [AG])*, juntamente como o haplótipo *CRDPAGCDART (*2A2-I [AG])* – para o qual p.377A é marcador - foram associados com proteção contra a FR e CRC, como descrito acima.

Não houve associação com algum haplótipo isolado, na comparação entre pacientes com CRC e FRo. Por outro lado, haplótipos que compartilham os polimorfismos CDVR, distribuídos do intron 9 ao exon 12 (*CRDLAGCDVRC* ou **1C1-I [AG]*, *CRDPAGCDVRC* ou **1A [AG]*, *CRDPGACDVRC* ou **1A [GA]* e *CRDPAGCDVRT* ou *2A1 [AG]*) mostraram-se mais frequentes nos pacientes com CRC, quando comparados com pacientes com FRo (22/206 ou 10,7% em pacientes CRC vs. 2/84 ou 2,4% em pacientes FRo, teste exato de Fisher $p=0,02$, $OR=4,9$ [IC 95%=1,13-21,34]). Esta associação permaneceu após correção pela idade, único fator demográfico associado à doença no modelo reduzido de regressão logística ($p=0,023$).

TABELA 10. FREQUÊNCIAS (%) DOS HAPLÓTIPOS DE *MASP2*.

	Haplótipos	Pacientes (N=290)	Controles (N=580)	Pacientes CRC (N=206)	Pacientes FRo (N=84)
<i>ARDP AG CYV RT</i>	<i>*2B2A-i [AG]</i>	181 (62,4)	380 (65,5)	124 (60,2)	57 (67,9)
<i>ARDP GA CYV RT</i>	<i>*2B2A-i [GA]</i>	3 (1,0)	4 (0,7)	2 (1,0)	1 (1,2)
<i>ARGP AG CYV RT</i>	<i>*2B2B-I [AG]</i>	5 (1,7)	6 (1,0)	4 (1,9)	1 (1,2)
<i>CQDP GA TDV RC</i>	<i>*1B2-h [GA]</i>	0	5 (0,9)	0	0
<i>CRDP AG CYV RT</i>	<i>*2B1-i [AG]</i>	13 (4,5)	19 (3,3)	11 (5,3)	2 (2,4)
<i>CRDP AG TDV RC</i>	<i>*1B1-h [AG]</i>	2 (0,7)	7 (1,2)	2 (1,0)	0
<i>CRDP GA CYV RT</i>	<i>*2B1-i [GA]</i>	7 (2,4)	11 (1,9)	4 (1,9)	3 (3,6)
<i>CRDP GA TDV RC</i>	<i>*1B1-h [GA]</i>	48 (16,6)	76 (13,1)	34 (16,5)	14 (16,7)
<i>ARDP AG TDV RC</i>	<i>*2B2A-i.1B1-h [AG]</i>	1 (0,3)	2 (0,3)	0	1 (1,2)
Com associação negativa à FR (OR=0,36 [IC95%=0,15-0,88], p=0,03)					
<i>CRDL AG CDV HC</i>	<i>*1C2-I [AG]</i>	0	6 (1,0)	0	0
<i>CRDP AG CDA RT</i>	<i>*2A2-I [AG]</i>	6 (2,1)	26 (4,5)	3 (1,5)	3 (3,6)
Com associação positiva à FR (OR=4,90 [IC95%=1,13-21,34], p=0,02)					
<i>CRDL AG CDV RC</i>	<i>*1C1-I [AG]</i>	6 (2,1)	2 (0,3)	6 (2,9)	0
<i>CRDP AG CDV RC</i>	<i>*1A [AG]</i>	13 (4,5)	24 (4,1)	11 (5,3)	2 (2,4)
<i>CRDP AG CDV RT</i>	<i>*2A1 [AG]</i>	1 (0,3)	3 (0,5)	1 (0,5)	0
<i>CRDP GA CDV RC</i>	<i>*1A [GA]</i>	4 (1,4)	9 (1,6)	4 (1,9)	0

LEGENDA: N: número de haplótipos, CRC: cardiopatia reumática crônica, FRo: pacientes sem acometimento cardíaco.

6.3 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MASP-2

As concentrações séricas de MASP-2 não apresentaram uma distribuição normal em nenhum dos grupos investigados, variando entre 34 ng/mL e 1200 ng/mL nos pacientes FR e 32,7 ng/mL e 1375 ng/mL, nos controles. Não houve diferença significativa entre a distribuição dos valores nestes controles, quantificados por ELISA comercial, e a distribuição encontrada com o uso de outra técnica (TRIFMA) em 77 controles previamente quantificados na Dinamarca, em um estudo anterior do nosso grupo (Tabela 11) (TULIO et al., 2011).

TABELA 11. CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 EM PACIENTES E CONTROLES.

	Controles (por ELISA)	Pacientes	CRC	FRo	Controles (por TRIFMA)
N	145	145	103	42	77
Valor mínimo	32,7	34,0	48,4	34,0	34,00
25% Percentil	217,5	153,0	153,1	152,0	232,0
Mediana	320,6	252,8	254,9	241,6	289,0
75% Percentil	633,8	324,7	325,3	329,8	398,5
Valor máximo	1375	1200	1200	1022	1264

LEGENDA: N: número de indivíduos; CRC: cardiopatia reumática crônica; FRo: pacientes sem acometimento cardíaco; ELISA: ensaio de imunoadsorção enzimática; TRIFMA: ensaio de imunoadsorção radioativo.

As concentrações de MASP-2 foram mais baixas nos pacientes, comparados aos controles (medianas de 253 ng/mL e 321 ng/mL, respectivamente, Mann-Whitney $p < 0,0001$) (Gráfico 1).

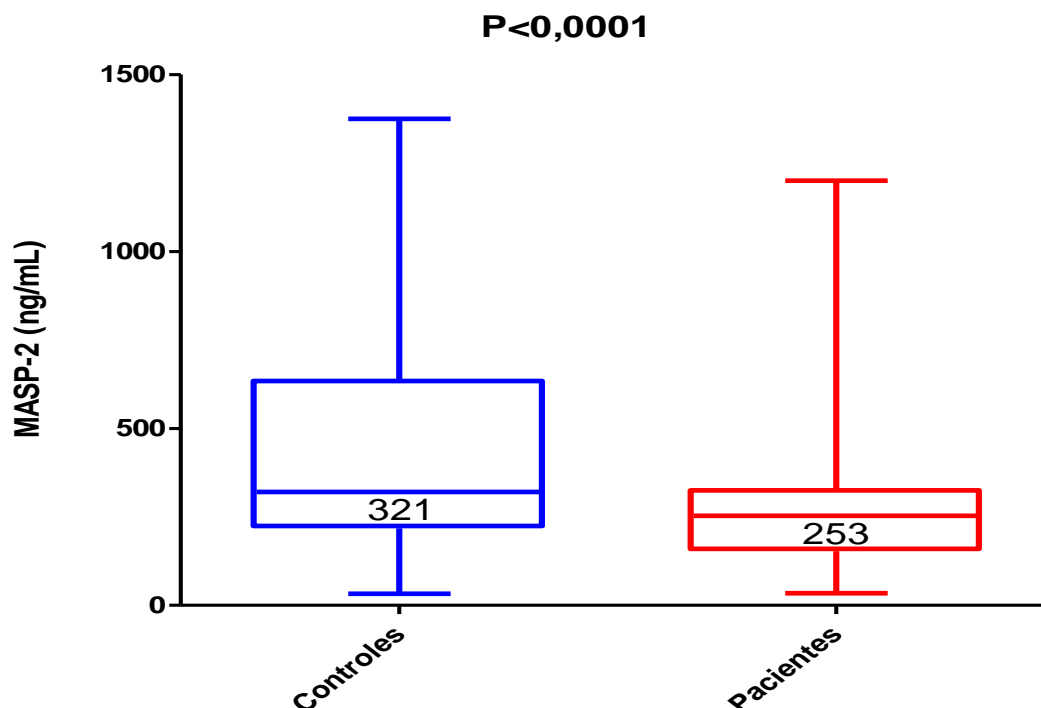


GRÁFICO 1. CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 EM PACIENTES E CONTROLES

NOTA: Medianas são mostradas no interior das caixas. Utilizado teste de Mann-Whitney.

A associação com as concentrações séricas foi independente da associação com genótipos baixo e alto produtores de MASP-2. Por exemplo, os SNPs rs2273344 (localizado no intron 4) e rs9430347 (localizado no intron 5), que estão flanqueando o exon 5 alternativo, foram associados com a modulação das concentrações de MASP-2 nos controles. Especificamente, indivíduos com o haplótipo GA apresentaram concentrações superiores aos dos homozigotos AG/AG (Gráfico 2). Porém, as concentrações de MASP-2 em indivíduos GA/GA foram mais baixas no grupo de pacientes, quando comparadas ao grupo controle (medianas 261 vs. 916 ng/ml, respectivamente, Mann-Whitney $p=0,012$).

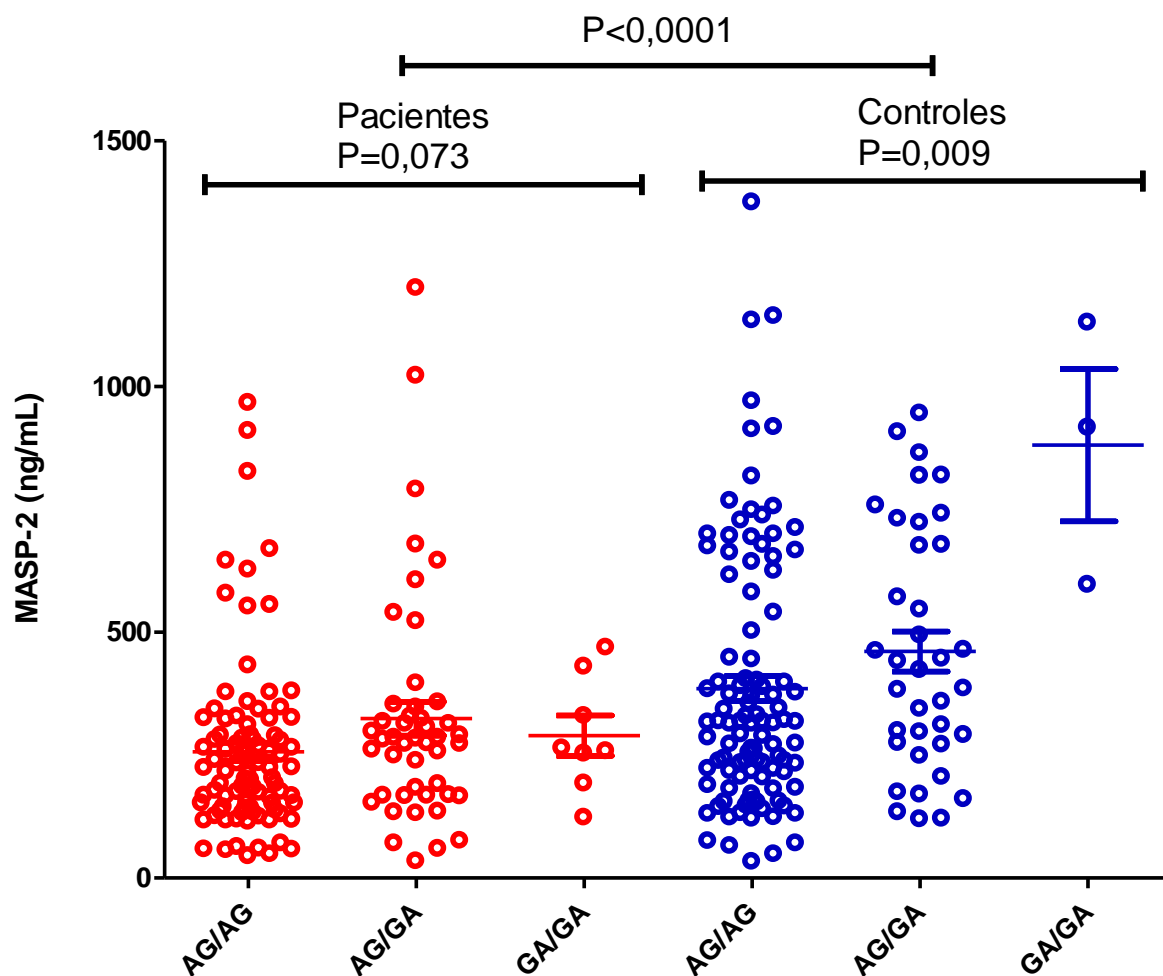


GRÁFICO 2. CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 ASSOCIADAS COM POLIMORFISMOS rs2273344 e rs9430347, QUE FLANQUEIAM O EXON 5 ALTERNATIVO.

NOTA: Medianas e intervalos Min-Max são mostrados. Valores de P foram obtidos por teste Kruskal-Wallis.

Resultado similar foi observado, ao avaliar genótipos compostos por haplótipos associados a altas concentrações de MASP-2 (igual ou superior a 600 ng/ml, produzidas por haplótipos contendo o sufixo *h*: *h/h* e *h/i*), concentrações médias (entre 200 e 600 ng/ml, produzidas por haplótipos com o sufixo *i*: *i/i*) e concentrações baixas (igual ou inferior a 200 ng/ml, produzidas por haplótipos com o sufixo *l*: *l/l* e *l/i*) (Gráfico 3).

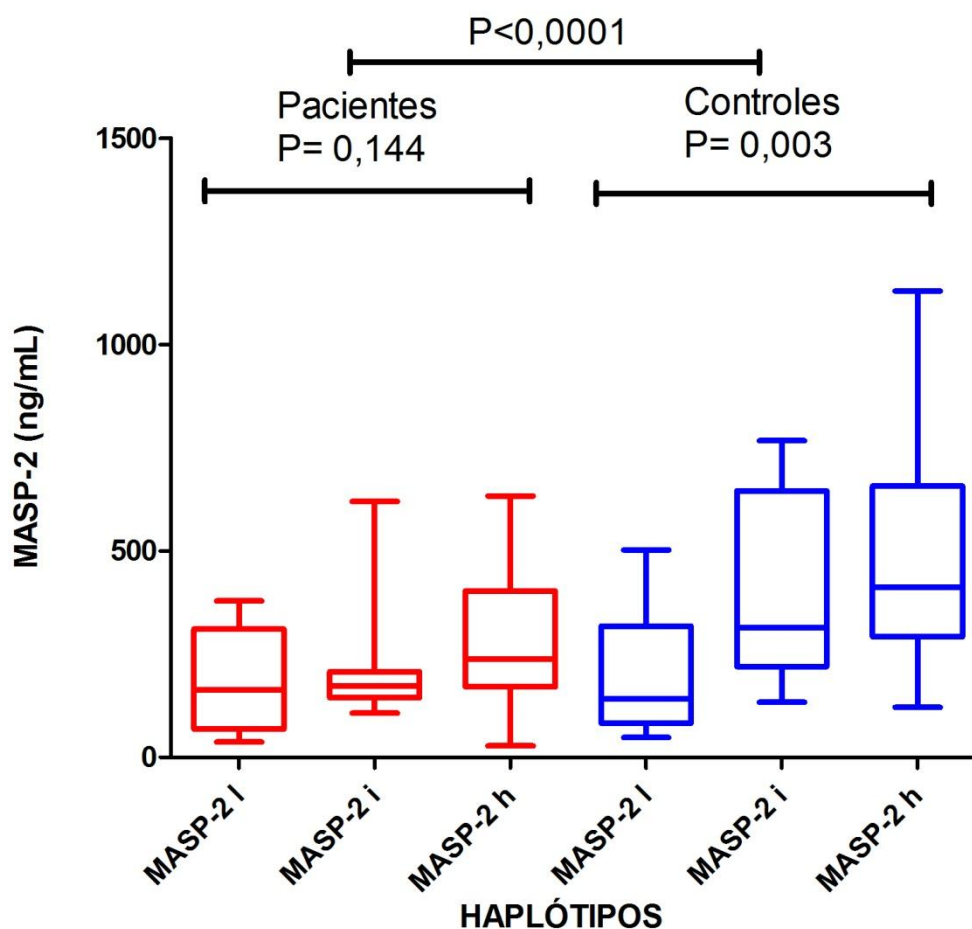


GRÁFICO 3. CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 ASSOCIADAS COM HAPLÓTIPOS ALTO (h), MÉDIO (i) E BAIXO (l) PRODUTORES.

NOTA: Medianas e intervalos Min-Max são mostrados. Valores de P foram obtidos por teste Kruskal-Wallis.

De fato, além de não diferirem entre si, as concentrações em pacientes obtidas para genótipos com haplótipos alto-produtores (h/h e h/i) e médio-produtores (i/i) foram inferiores aos controles de mesmo genótipo (Mann-Whitney $p=0,009$ e $p=0,002$, respectivamente, Gráficos 4).

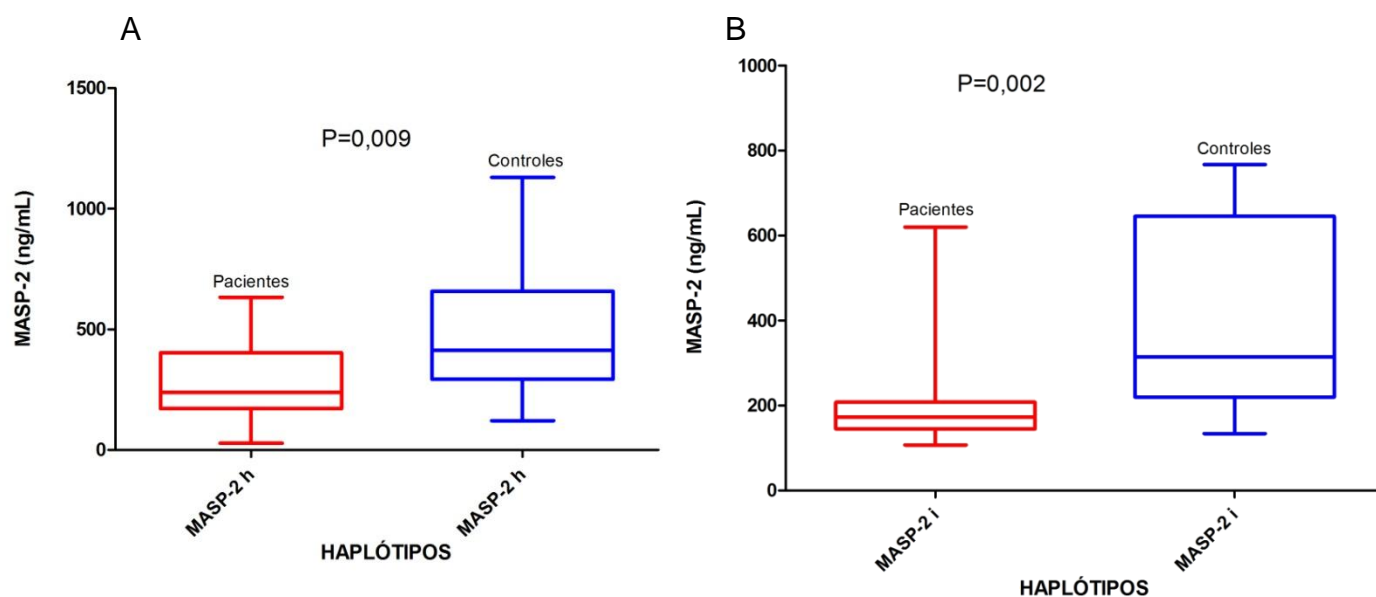


GRÁFICO 4. DIFERENÇAS ENTRE CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 EM INDIVÍDUOS COM MESMO GENÓTIPO.

NOTA: A) Genótipos associados à alta produção de MASP-2. B) Genótipos associados à produção intermediária de MASP-2. Medianas e intervalos Min-Max são mostrados. Valores de P foram obtidos por teste Mann-Whitney.

Na análise por regressão logística simples, concentrações menores ou iguais a 200 ng/mL foram positivamente associadas à doença (OR=2,63 [IC95%=1,56-4,43], $p<0,0001$). Por outro lado, concentrações superiores ou iguais a 600 ng/mL foram negativamente associadas à mesma (OR=0,25 [IC95%=0,13-0,51], $p<0,0001$). As associações observadas com concentrações iguais ou inferiores a 200 ng/mL e iguais ou superiores a 600 ng/mL, assim como as previamente mencionadas com os alelos p.377A e p.439H, permaneceram após correção, nos modelos reduzidos de regressão logística (comparando controles com pacientes em geral e pacientes CRC). Estas associações são, portanto, independentes uma da outra (Tabela 12).

TABELA 12. ASSOCIAÇÕES ENCONTRADAS ENTRE MASP-2 E A FEBRE REUMÁTICA.

Controles vs. Pacientes			
N total = 288	Odds Ratio	[IC95%]	P
P modelo <0,00001			
≤ 200 ng/ml	2,06	1,19 – 3,56	0,010
≥ 600 ng/ml	0,35	0,17 – 0,72	0,004
p.377A + p.439H	0,36	0,13 – 0,98	0,045
Controles vs. Pacientes CRC			
N total = 246	Odds Ratio	[IC95%]	P
P modelo <0,00001			
≤ 200 ng/ml	2,15	1,19 – 3,90	0,012
≥ 600 ng/ml	0,27	0,11 - 0,65	0,004
p.377A + p.439H	0,21	0,06 – 0,78	0,019

Contudo, não houve associação entre as concentrações de MASP-2 entre FRo e CRC (Gráfico 5).

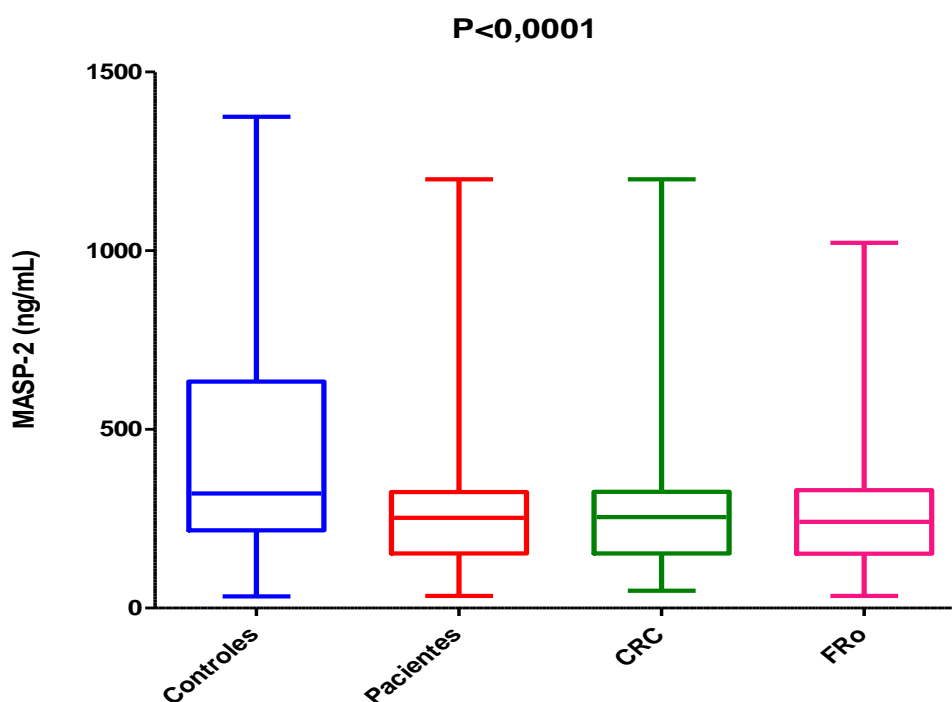


GRÁFICO 5. CONCENTRAÇÕES DE MASP-2 EM TODOS OS GRUPOS ANALISADOS

NOTA: CRC: pacientes com cardiopatia reumática crônica; FRo: pacientes sem acometimento cardíaco; utilizado teste de Kruskal-Wallis.

7 DISCUSSÃO

A FR ainda é uma doença de grande repercussão na saúde pública de países em desenvolvimento, onde a incidência é alta e os custos com cirurgia cardíaca são expressivos (GUILHERME; KALIL, 2013). Portanto, as tentativas de elucidar os mecanismos etiopatogênicos e autoimunes desta doença são de relevância científica e clínica. A proteção contra patógenos depende de interações complexas entre a resposta imune inata e adaptativa, que são geneticamente controladas (GUILHERME; KÖHLER; KALIL, 2012). A FR ocorre em indivíduos geneticamente predispostos, afetando 0,3% do total de crianças infectadas pelo EGA (BARBOSA et al., 2009). Diversos polimorfismos em genes que codificam moléculas envolvidas tanto na resposta imune inata, como na adaptativa, contribuem na suscetibilidade a FR e CRC. A resposta imune inata fornece a primeira linha de defesa contra infecções, onde a ativação da cascata do complemento desempenha importante papel contra a infecção pelo *S. pyogenes*. Diversos pesquisadores demonstraram que o EGA é capaz de recrutar a superfície bacteriana diferentes proteínas reguladoras do complemento, incluindo o Fator H, FHL-1, C4BP e CD46, principalmente através da proteína M, dímero ancorado na sua membrana. Dessa forma, o EGA pode escapar da opsonofagocitose mediada pelo complemento e se disseminar pelo hospedeiro (OLIVER et al., 2008; ERMERT et al., 2013). Contudo, foi demonstrada deposição do complexo lítico de ataque à membrana no septo associado com a divisão desse bacilo (BERENDS et al., 2013).

Diversos pesquisadores já demonstraram o papel da deficiência de componentes da via das lectinas na suscetibilidade a infecções (MUNTHER-FOG et al., 2009; SKATTUM et al., 2011; STENGAARD-PEDERSEN et al., 2003; THIEL et al., 2007; WEISS et al., 2007; DEGN et al., 2011). No caso da febre reumática, sabe-se que MBL é capaz de se ligar fortemente a N-acetil- β D-glucosamina da parede do estreptococo *in vitro*, promovendo deposição do complemento (NETH et al., 2000). Ao contrário, alelos não funcionais de *MBL2* foram associados com regurgitação aórtica grave de etiologia reumática em pacientes brasileiros. Contudo, o mesmo não foi encontrado para o alelo não funcional p.D120G de *MASP2* (RAMASAWMY et al. 2008). Similarmente, a deficiência de complemento associada a *C4A*6* e alelos nulos de C4 apresentaram associação com a CRC, em estudo anterior do nosso

grupo (DE MESSIAS; CAVALCANTI; RADOMINSKI, 1995). Polimorfismos de *FCN2* associados a baixas concentrações de ficolina L podem aumentar a predisposição individual à infecção estreptocócica recorrente ou mais grave, tendo sido, como esperado, associados a FR (MESSIAS-REASON et al., 2009).

Portanto, polimorfismos dos componentes da via das lectinas são capazes de modular a gravidade da FR (BOLDT et al., 2012). Contudo, a ativação excessiva do complemento, característica de doenças inflamatórias e autoimunes como a FR, pode contribuir para o desenvolvimento da cardiopatia reumática. De fato, em estudos anteriores do nosso grupo, pacientes homozigotos para o alelo funcional de MBL (*A/A*) apresentaram quase o dobro da concentração de MBL observada em controles, com o mesmo genótipo. Além disso, os alelos codificadores de MBL não funcional foram menos frequentes nos pacientes que nos controles, levando os autores a sugerir que a deficiência de MBL poderia ter um efeito benéfico na doença (MESSIAS REASON et al., 2006; SCHAFRANSKI et al., 2004). Neste sentido, é interessante observar que a degeneração do tecido mixomatoso ocorre em um número elevado de válvulas cardíacas de pacientes com CRC (NAYAR; NAYAR; CHERIAN, 2006). Tecido mixomatoso é rico em ácido hialurônico, um polissacarídeo de alto peso molecular rico em sequências repetitivas de ácido glucorônico e N-acetilglucosamina, ligantes de MBL.

Neste estudo, investigou-se onze diferentes polimorfismos do gene *MASP2*, compreendendo variantes localizadas desde o promotor até o exon 12, por meio de uma técnica que permitiu a haplotipagem física de 15 diferentes haplótipos de *MASP2*. O haplótipo *ARDPCYVRT* (**2B2A-i*), associado a concentrações intermediárias de MASP-2, foi o mais frequente tanto em pacientes, quanto em controles, estando sua frequência nos controles (66,2%) de acordo com o estimado para a população brasileira (65,5%) (BOLDT et al., 2011). O segundo haplótipo com maior frequência foi *CRDPTDVRC* (**1B1-h*), associado a altas concentrações de MASP-2, cuja frequência nos controles (14,3%) também está de acordo com a frequência relatada de 14,4% em uma população do sul do Brasil (BOLDT et al., 2011). Haplótipos menos comuns, como *CQDPGATDVRC* (**1B2-h [GA]*) e *CRDLAGCDVHC* (**1C2-I [AG]*), foram encontrados somente no grupo controle. Isto está de acordo com o estudo de BOLDT et al. (2011), no qual **1C2-I* e **1B2-h* foram encontrados com frequências alélicas de apenas 0,32% e 1,3%, respectivamente, na

população do sul do Brasil. A origem mais provável para estes haplótipos é africana (THIEL et al. 2007), sendo que a baixa frequência encontrada neste estudo reflete a composição majoritária de euro-descendentes, com baixa miscigenação africana, dos grupos investigados. Observou-se ausência de associação entre a doença e o polimorfismo p.D120G, que está associado com a produção de uma proteína incapaz de se ligar a MBL e de ativar a via das lectinas. Esses dados confirmam resultados anteriores, descritos pelo nosso grupo, para estes mesmos pacientes (SCHAFRANSKI et al., 2008; RAMASAWMY et al., 2008). Contudo, deve-se considerar que a frequência desta mutação em homozigose é baixa, de aproximadamente 0,15% em europeus, 0,01% na população sul-brasileira e 0% em afro-descendentes, chineses e ameríndios (THIEL et al. 2007, BOLDT et al. 2011). No presente estudo, não se identificou nenhum indivíduo homozigoto para a mutação p.D120G, o que provavelmente se deve ao tamanho amostral. Portanto, devem ser conduzidos estudos futuros com expressivo aumento amostral, a fim de se avaliar o papel dessa mutação na FR, em estado homozigoto.

Esta também é a primeira vez em que são avaliados polimorfismos do gene *MASP2* diferentes de p.D120G em pacientes com FR. Através dos resultados obtidos, foi possível demonstrar uma associação entre os SNPs p.V377A e p.R439H, e os haplótipos para os quais são marcadores (**2A2-I* e **1C2-I*, respectivamente), com a proteção contra a FR e a CRC. Enquanto p.439H foi ausente no grupo de pacientes, ocorreu com frequência um pouco acima da prevista em controles (1%), segundo a estimativa para a população sul-brasileira (0,32% - BOLDT et al. 2011). Similarmente, p.377A ocorreu nos controles com frequência de 4,5% e nos pacientes 2,1%. Estes SNPs são conhecidos pela sua associação com baixas concentrações de MASP-2 (THIEL et al., 2007; THIEL et al., 2009). O polimorfismo p.439H, embora capaz de se associar a MBL não ativa o complemento (THIEL et al. 2007) e foi relatado como fator de proteção contra a malária placentária (HOLMBERG et al., 2012).

Provavelmente, o efeito protetor destes polimorfismos pode estar relacionado a uma menor capacidade de ativação da via das lectinas e na resposta inflamatória da CRC. Por outro lado, estes mesmos alelos foram recentemente descritos aumentando a suscetibilidade à hanseníase e à sua forma lepromatosa (BOLDT et al., 2013). As associações contrastantes dos polimorfismos p.V377A e

p.R439H parecem resultar dos diferentes mecanismos relacionados à etiopatogenia das doenças, uma vez que a infecção por *Mycobacterium leprae*, ao contrário da infecção pelo estreptococo beta-hemolítico, é dependente do processo de opsonofagocitose. Este processo, quando mediado por MBL, pode ser bloqueado *in vitro* com a adição de MASP-2 (DUUS et al., 2010). Logo, baixas concentrações de MASP-2 favoreceriam a opsonofagocitose mediada por MBL (BOLDT et al. 2013). Como MASP-2 é uma molécula pleiotrópica, atuando na fagocitose, ativação do complemento e coagulação, provavelmente essa exerce papel diferencial nas infecções por microrganismos intra ou extracelulares (MAYILYAN, 2012; THIEL et al., 2007, 2009).

A suscetibilidade à CRC, por sua vez, foi associada a haplótipos que compartilham os polimorfismos **CDVR**: *CRDLAGCDVRC* ou **1C1-I* [AG], *CRDPAGCDVRC* ou **1A* [AG], *CRDPGACDVRC* ou **1A* [GA] e *CRDPAGCDVRT* ou *2A1* [AG]. Estes haplótipos estão associados a níveis variados de MASP-2, sendo filogeneticamente relacionados como o haplótipo mais antigo (*CRDPCDVRC* ou **1A*) (BOLDT et al., 2011). Provavelmente, abrigam outros polimorfismos não investigados neste estudo, os quais poderiam estar associados com a doença. Curiosamente, p.371D (que corresponde ao *D* do haplótipo *CDVR*, acima mencionado) também foi relatado aumentando a suscetibilidade a infecção pelo vírus da hepatite C (TULIO et al., 2011) e *CD* foi anteriormente encontrado associado à suscetibilidade aumentada a cardiomiopatia chagásica (BOLDT et al., 2011). Corroborando a falta de associação clara entre haplótipos com *CDV* e concentrações séricas da proteína, não foi observada associação entre as concentrações de MASP-2 e a CRC. Em outro estudo, também não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de MASP-2 em pacientes submetidos a hemodiálise e controles (ISHII et al., 2011), nem em pacientes com pênfigo foliáceo e controles (MESSIAS-REASON et al., 2008).

O imunoensaio sanduíche para a quantificação de MASP-2 está baseado no uso de dois anticorpos monoclonais, um apto a captar a porção N-terminal da proteína, e outro capaz de se ligar à porção C-terminal da mesma (MØLLER-KRISTENSEN et al., 2003). Os mesmos anticorpos são utilizados no imunoensaio radioativo, empregado na quantificação de doadores de sangue sul-brasileiros, em estudo anterior do nosso grupo (TULIO et al., 2011). Os resultados da quantificação

por ELISA e TRIFMA nos dois grupos de indivíduos sul-brasileiros, foram comparáveis. Nesta investigação, foi confirmada a recente observação que polimorfismos intrônicos que flanqueiam o exon 5 (rs2273344 e rs 9430347) estão associados com a modulação das concentrações de MASP-2 (BOLDT et al., 2013). Também foram confirmadas associações reportadas entre os polimorfismos p.D120G, p.P126L, p.V377A, p.R439H, abrigados nos haplótipos com os sufixos *h*, *i* e *l*, com as concentrações séricas da proteína (THIEL et al. 2007, 2009; BOLDT et al. 2011).

Contudo, ao contrário do observado nos controles, as concentrações de MASP-2 não foram associadas aos genótipos dos pacientes. Durante o processo de auto-ativação de MASP-2 (que ocorre sob altas concentrações séricas da proteína) ou de transativação mediada por MASP-1 (sob concentrações normais ou baixas de MASP-2), há uma clivagem que separa a cadeia B, representada pelo domínio C-terminal de serina protease, da cadeia A, representada pelos demais domínios da proteína (CUB1, EGF, CUB2, CCP1 e CCP2) (DEGN et al., 2012). Logo, as baixas concentrações de MASP-2 podem simplesmente refletir a alta taxa de consumo da proteína, resultante da ativação da via das lectinas. De fato, a ativação descontrolada desta via pode ser uma das causas do dano inflamatório observado na doença, corroborando a hipótese levantada pelo nosso grupo para explicar a associação entre altas concentrações de MBL, baixa frequência de alelos não funcionais de *MBL2* e suscetibilidade à FR (MESSIAS REASON et al., 2006; SCHAFRANSKI et al., 2004). Esta hipótese deverá ser corroborada com ensaios funcionais de ativação do complemento. As concentrações de MASP-2 também foram inferiores em pacientes com infarto do miocárdio comparado a controles, sugerindo um envolvimento da proteína e, conseqüentemente, da ativação da via das lectinas nas lesões de isquemia e necrose do miocárdio (ZHANG et al., 2013). Zehnder et al. também encontraram uma associação entre concentrações altas de MASP-2 e melhora na sobrevida de pacientes com malignidades hematológicas (ZEHNDER et al., 2009).

Concluindo, polimorfismos de *MASP2* associados à baixa produção de MASP-2 possivelmente limitam a ativação do complemento e, conseqüentemente, diminuem a susceptibilidade a FR. Baixas concentrações de MASP-2 na FR possivelmente refletem o consumo da proteína em pacientes com a doença. Por fim,

a elucidação do papel desempenhado por MASP-2 na suscetibilidade a FR poderá auxiliar no desenho de estratégias de prevenção e tratamento da doença.

8 CONCLUSÕES

- Foram identificados quinze diferentes haplótipos do gene *MASP2*, a partir dos onze SNPs pesquisados: (*1A [AG], *1A [GA], *1B1-h [AG], *1B1-h[GA], *1B2-h [GA], *1C1-I [AG], *1C2-I [AG], *2A1 [AG], *2A2-I [AG], *2B1-i [AG], *2B1-i [GA], *2B2A-i [AG], 2B2A-i [GA], *2B2B-I [AG], *2B2A-i.1B1-h [AG]), sendo 13 presentes nos pacientes com FR e 15 nos controles;
- Houve associação negativa entre os haplótipos de *MASP2* *CRDPAGCDART ou *2A2-I e CRDLAGCDVHC ou *1C2-I e a FR;
- O mesmo efeito de proteção contra a FR foi observado para os genótipos de *MASP2* que incluem os haplótipos CRDPAGCDART ou *2A2-I e CRDLAGCDVHC ou *1C2-I;
- Os haplótipos de *MASP2* contendo CDVR (compreendendo CRDLAGCDVRC ou *1C1-I [AG], CRDPAGCDVRC ou *1A [AG], CRDPGACDVRC ou *1A [GA] e CRDPAGCDVRT ou *2A1 [AG]) mostraram-se associados com aumento de susceptibilidade a CRC, dentre os grupos de pacientes;
- Foi confirmada a associação entre os SNPs rs2273344 e rs9430347, assim como de haplótipos alto, médio e baixo produtores e as concentrações de MASP-2 nos pacientes e controles;
- As concentrações séricas de MASP-2 foram significativamente mais baixas nos pacientes, em relação aos controles;
- Os resultados obtidos levam-nos a sugerir que polimorfismos do gene *MASP2* podem influenciar na susceptibilidade à FR e a CRC.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7°. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 1–545

ALI, Y. M. et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 7, p. e1002793, jan. 2012.

BAIRD, R. W. et al. Epitopes of group A streptococcal M protein shared with antigens of articular cartilage and synovium. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 146, n. 9, p. 3132–7, 1 maio 1991.

BARASH, J. Rheumatic Fever and post-group a streptococcal arthritis in children. **Current infectious disease reports**, v. 15, n. 3, p. 263–8, jun. 2013.

BARBOSA, P. et al. Diretrizes Brasileiras para o Diagnóstico , Tratamento e Prevenção da Febre Reumática. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 93, p. 1–18, 2009.

BERENDS, E. T. M. et al. Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 12, p. 1955–68, dez. 2013.

BOLDT, A B. W. et al. Multiplex sequence-specific polymerase chain reaction reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and MAp19 serum levels. **Human immunology**, v. 72, n. 9, p. 753–60, set. 2011.

BOLDT, A B. W.; GOELDNER, I.; MESSIAS-REASON, I. J. DE. Relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. In: **Advances in Clinical Chemistry**. [s.l: s.n.]. p. 105–53.

BOLDT, A. B. W. et al. Association of a new mannose-binding lectin variant with severe malaria in Gabonese children. **Genes and immunity**, v. 7, n. 5, p. 393–400, jul. 2006.

BOLDT, A. B. W. et al. Leprosy association with low MASP-2 levels generated by MASP2 haplotypes and polymorphisms flanking MASP19 exon 5. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69054, jan. 2013.

BOLDT, A. B. W.; GOELDNER, I.; DE MESSIAS-REASON, I. J. T. Relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 56, p. 105–153, 2012.

BOLDT, A. B. W.; LUZ, P. R.; MESSIAS-REASON, I. J. T. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 140, n. 1, p. 63–70, jul. 2011.

BONOW, R.; LIBBY, P.; MANN, D. **Braunwald Tratado de doenças Cardiovasculares**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BOUWMAN, L. H.; ROEP, B.; ROOS, A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. **Human immunology**, v. 67, n. 4-5, p. 247–56, 2006.

BREDA, L. et al. Rheumatic fever: a disease still to be kept in mind. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 52, n. 5, p. 953, maio 2013.

BRONKHORST, M. W. G. A et al. Risk of infection and sepsis in severely injured patients related to single nucleotide polymorphisms in the lectin pathway. **The British journal of surgery**, v. 100, n. 13, p. 1818–26, dez. 2013.

BURKE, R. J.; CHANG, C. Diagnostic criteria of acute rheumatic fever. **Autoimmunity reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 503–507, 2014.

CARAPETIS, J. R. et al. The global burden of group A streptococcal diseases. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, n. 11, p. 685–94, nov. 2005.

CHANG, C. Cutting Edge Issues in Rheumatic Fever. **Clinical reviews in allergy & immunology**, p. 1–25, 2011.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6°. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

CUNNINGHAM, M. W. Pathogenesis of group A streptococcal infections. **Clinical Microbiol Rev**, v. 13, n. 3, p. 470–511, 2000.

DAJANI, A. S. et al. **Guidelines for the Diagnosis of Rheumatic Fever: Jones Criteria, 1992 Update**JAMA: The Journal of the American Medical Association, 1992.

DALE, J. B. et al. Group A streptococcal vaccines: paving a path for accelerated development. **Vaccine**, v. 31, n. 2, p. 216–22, 18 abr. 2013.

DE AMICIS, K. M. et al. Analysis of the coverage capacity of the StreptInCor candidate vaccine against *Streptococcus pyogenes*. **Vaccine**, p. 1–7, 27 ago. 2013.

DE MESSIAS, I. J.; CAVALCANTI, E.; RADOMINSKI, S. C. Increased frequency of the C4A*6 rare allele in rheumatic heart disease. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 24, n. 3, p. 164–8, jan. 1995.

DE ROOIJ, B.-J. F. et al. Lectin complement pathway gene profile of donor and recipient determine the risk of bacterial infections after orthotopic liver transplantation. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 52, n. 3, p. 1100–10, set. 2010.

DEGN, S. E. et al. MAP44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 11, p. 7371–8, 1 dez. 2009.

DEGN, S. E. et al. Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 8, p. 3957–69, 15 out. 2012.

DEGN, S. E.; JENSENIUS, J. C.; THIEL, S. Disease-causing mutations in genes of the complement system. **American journal of human genetics**, v. 88, n. 6, p. 689–705, 10 jun. 2011.

DEGN, S. E.; THIEL, S. Humoral Pattern Recognition and the Complement System. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 78, n. 2, p. 181–193, 21 ago. 2013.

DELUNARDO, F. et al. Streptococcal-vimentin cross-reactive antibodies induce microvascular cardiac endothelial proinflammatory phenotype in rheumatic heart disease. **Clinical and experimental immunology**, v. 173, n. 3, p. 419–29, set. 2013.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, jan. 2010.

DUUS, K. et al. CD91 interacts with mannan-binding lectin (MBL) through the MBL-associated serine protease-binding site. **The FEBS journal**, v. 277, n. 23, p. 4956–64, dez. 2010.

ERMERT, D. et al. Binding of complement inhibitor C4b-binding protein to a highly virulent *Streptococcus pyogenes* M1 strain is mediated by protein H and enhances adhesion to and invasion of endothelial cells. **The journal of biological chemistry**, v. 288, n. 45, p. 32172–83, 8 nov. 2013.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564–7, maio 2010.

FEINBERG, H. et al. Crystal structure of the CUB1-EGF-CUB2 region of mannose-binding protein associated serine protease-2. **The EMBO journal**, v. 22, n. 10, p. 2348–59, 15 maio 2003.

GÁL, P. et al. A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33435–44, 30 set. 2005.

GARCÍA-LAORDEN, M. I. et al. Low clinical penetrance of mannose-binding lectin-associated serine protease 2 deficiency. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 118, n. 6, p. 1383–6, dez. 2006.

GUILHERME, L. et al. Association of human leukocyte class II antigens with rheumatic fever or rheumatic heart disease in a Brazilian population. **Circulation**, v. 83, n. 6, p. 1995–8, 1991.

GUILHERME, L. et al. Molecular pathogenesis of rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 7, n. 28, p. 1–15, 2005.

GUILHERME, L. et al. Genes, autoimmunity and pathogenesis of rheumatic heart disease. **Annals of pediatric cardiology**, v. 4, n. 1, p. 13–21, jan. 2011.

GUILHERME, L.; KALIL, J. Rheumatic fever: the T cell response leading to autoimmune aggression in the heart. **Autoimmunity reviews**, v. 1, n. 5, p. 261–6, out. 2002.

GUILHERME, L.; KALIL, J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading autoimmune reactivity and disease. **Journal of clinical immunology**, v. 30, n. 1, p. 17–23, jan. 2010.

GUILHERME, L.; KALIL, J. Rheumatic Heart Disease: Molecules Involved in Valve Tissue Inflammation Leading to the Autoimmune Process and Anti-S. pyogenes Vaccine. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. October, p. 352, jan. 2013.

GUILHERME, L.; KALIL, J.; CUNNINGHAM, M. W. Molecular mimicry in the autoimmune pathogenesis of rheumatic heart disease. **Autoimmunity reviews**, v. 39, n. 1, p. 31–9, 2006.

GUILHERME, L.; KO, K. Rheumatic Heart Disease : Mediation by Complex Immune Events. v. 53, n. 11, 2011.

GUILHERME, L.; KÖHLER, K. F.; KALIL, J. Rheumatic Heart Disease : Genes , Inflammation and Autoimmunity. **Rheumatology Current Research**, v. S4:001, p. 1–5, 2012.

GUILHERME, L.; RAMASAWMY, R.; KALIL, J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: genetics and pathogenesis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 66, n. 2-3, p. 199–207, 2007.

GULLA, K. C. et al. Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 482–95, abr. 2010.

GUSTAFSSON, M. C. U. et al. Factor H binds to the hypervariable region of many *Streptococcus pyogenes* M proteins but does not promote phagocytosis resistance or acute virulence. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 4, p. e1003323, jan. 2013.

HAAPASALO, K. et al. Acquisition of complement factor H is important for pathogenesis of *Streptococcus pyogenes* infections: evidence from bacterial in vitro survival and human genetic association. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 1, p. 426–35, 1 jan. 2012.

HÉJA, D. et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, p. 10498–503, 26 jun. 2012.

HESS, C.; STEIGER, J.; SCHIFFERLI, J. Complement and its role in immune response. **Schweiz Med Wochenschr**, v. 128, n. 11, p. 393–9, 1998.

HOLMBERG, V. et al. Mutations of complement lectin pathway genes MBL2 and MASP2 associated with placental malaria. **Malaria journal**, v. 11, p. 61, jan. 2012.

IRLAM, J. et al. Primary prevention of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease with penicillin in South African children with pharyngitis: a cost-effectiveness analysis. **Circulation. Cardiovascular quality and outcomes**, v. 6, n. 3, p. 343–51, 1 maio 2013.

ISHII, M. et al. Serum concentration of complement components of the lectin pathway in maintenance hemodialysis patients, and relatively higher levels of L-Ficolin and MASP-2 in Mannose-binding lectin deficiency. **Therapeutic apheresis and dialysis**, v. 15, n. 5, p. 441–7, out. 2011.

ITURRY-YAMAMOTO, G.; PORTINHO, C. Sistema complemento: Ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Rev Ass Med Brasil**, v. 47, n. 1, p. 41–51, 2001.

JIN, Z.; JI, Z.; HU, J. [Mannose-binding lectin gene site mutations and the susceptibility of rheumatic heart disease]. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 81, n. 21, p. 1284–6, 10 nov. 2001.

KAMBLOCK, J. et al. Does rheumatic myocarditis really exists? Systematic study with echocardiography and cardiac troponin I blood levels. **European Heart Journal**, v. 24, n. 9, p. 855–62, 2003.

KAPLAN, M. H.; DALLENBACH, F. D. Immunologic studies of heart tissue. III. Occurrence of bound gamma globulin in auricular appendages from rheumatic hearts. Relationship to certain histopathologic features of rheumatic heart disease. **The Journal of experimental medicine**, v. 113, p. 1–16, 1 jan. 1961.

KASPER, D.; FANCI, A.; BRAUNWALD, E. **Harrison Medicina Interna**. 15°. ed. [s.l: s.n.].

KERR, F. K. et al. Elucidation of the substrate specificity of the MASP-2 protease of the lectin complement pathway and identification of the enzyme as a major physiological target of the serpin, C1-inhibitor. **Molecular immunology**, v. 45, n. 3, p. 670–7, fev. 2008.

KINSLEY, R.; GIRDWOOD, R.; MILNER, S. Surgical treatment during the acute phase of rheumatic carditis. **Annals of Vascular Surgery**, v. 13, p. 299–323, 1981.

KUMAR, R. K.; TANDON, R. Rheumatic fever & rheumatic heart disease: the last 50 years. **The Indian journal of medical research**, v. 137, n. 4, p. 643–58, abr. 2013.

LAARMAN, A. et al. Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 88, n. 2, p. 115–20, fev. 2010.

LAMBRIS, J. D.; RICKLIN, D.; GEISBRECHT, B. V. Complement evasion by human pathogens. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 132–42, fev. 2008.

LYNCH, N. J. et al. L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 2, p. 1198–202, 15 jan. 2004.

MADSEN, H. O. et al. Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis. **Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 959–60, 19 set. 1998.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; FUJITA, T. Structural and functional overview of the lectin complement pathway: its molecular basis and physiological implication. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 61, n. 4, p. 273–83, ago. 2013.

MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, p. 1497–1502, 1992.

MAURICE, J. Rheumatic heart disease back in the limelight. **The Lancet**, v. 382, n. 9898, p. 1085–1086, set. 2013.

MAYILYAN, K. R. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. **Protein & cell**, v. 3, n. 7, p. 487–96, jul. 2012.

MCNEIL, S. A. et al. Safety and immunogenicity of 26-valent group a streptococcus vaccine in healthy adult volunteers. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 41, n. 8, p. 1114–22, 15 out. 2005.

MESSIAS REASON, I. J. et al. The association between mannose-binding lectin gene polymorphism and rheumatic heart disease. **Human immunology**, v. 67, n. 12, p. 991–8, dez. 2006.

MESSIAS-REASON, I. et al. Circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 in endemic pemphigus foliaceus. **Clinical and experimental dermatology**, v. 33, n. 4, p. 495–7, jul. 2008.

MESSIAS-REASON, I. J. et al. Ficolin 2 (FCN2) functional polymorphisms and the risk of rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Clinical and experimental immunology**, v. 157, n. 3, p. 395–9, set. 2009.

MILLER, C. et al. Molecular defects in the mannose binding lectin pathway in dermatological disease: Case report and literature review. **Clinical and molecular allergy : CMA**, v. 8, p. 6, jan. 2010.

MØLLER-KRISTENSEN, M. et al. Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals. **Journal of Immunological Methods**, v. 282, n. 1-2, p. 159–167, nov. 2003.

MØLLER-KRISTENSEN, M. et al. Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. **International immunology**, v. 19, n. 2, p. 141–9, fev. 2007.

MUNTHER-FOG, L. et al. Immunodeficiency Associated with FCN3 Mutation and Ficolin-3 Deficiency. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 25, p. 2637–2644, 18 jun. 2009.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Janeway's immunobiology**. 7°. ed. New York: Garland Science, 2008. p. 887

NAYAR, S.; NAYAR, P. G.; CHERIAN, K. M. Heart valve structure: a predisposing factor for rheumatic heart disease. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 92, n. 8, p. 1151–2, ago. 2006.

NETH, O. et al. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 688–93, fev. 2000.

OLESEN, H. et al. The mannan-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis-disfunction of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) may be a major modifier. **Clinical Immunology**, v. 121, n. 3, p. 324–31, 2006.

OLIVER, M. A. et al. Binding of complement regulatory proteins to Group A Streptococcus. **Vaccine**, v. 26, p. 175–178, dez. 2008.

ORAN, B. et al. Serum cardiac troponin-I in active rheumatic carditis. **Indian journal of pediatrics**, v. 68, n. 10, p. 934–4, 2001.

PASTORE, S. et al. The resurgence of rheumatic fever in a development country area: the role of echocardiography. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 50, n. 2, p. 396–400, 2011.

RAIZADA, V. et al. Tissue distribution of lymphocytes in rheumatic heart valves as defined by monoclonal anti-T cell antibodies. **The American journal of medicine**, v. 74, n. 1, p. 90–6, 1983.

RAMASAWMY, R. et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 15, n. 6, p. 932–6, jun. 2008.

REDDY, K. S. et al. Immunologic and immunogenetic studies in rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Indian journal of pediatrics**, v. 57, n. 5, p. 693–700, 1990.

REDONDO ROBLES, L. et al. Hemicorea de Sydenham como manifestación de fiebre reumática. **An Pediatr (Barc)**, v. 80, n. 2, p. 1–2, 2014.

REMENYI, B. et al. Position statement of the World Heart Federation on the prevention and control of rheumatic heart disease. **Nature reviews. Cardiology**, v. 10, n. 5, p. 284–92, maio 2013.

REUTER, M. et al. Binding of the human complement regulators CFHR1 and factor H by streptococcal collagen-like protein 1 (Scl1) via their conserved C termini allows control of the complement cascade at multiple levels. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 49, p. 38473–85, 3 dez. 2010.

RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature immunology**, v. 11, n. 9, p. 785–97, set. 2010.

ROBERTS, K. et al. Screening for rheumatic heart disease: current approaches and controversies. **Nature reviews. Cardiology**, v. 10, n. 1, p. 49–58, jan. 2013.

ROORYCK, C. et al. Mutations in the lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. **Nat Genet**, v. 43, n. 3, p. 197–203, mar. 2011.

SAIKI, R. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487–91, 1988.

SAIKIA, U. N. et al. Adhesion molecule expression and ventricular remodeling in chronic rheumatic heart disease: a cause or effect in the disease progression - a pilot study. **Cardiovascular Pathology**, v. 21, n. 2, p. 83–8, 2012.

SAPRU, R. P. et al. Cellular reaction to group A beta-haemolytic streptococcal membrane antigen and its relation to complement levels in patients with rheumatic heart disease. **British medical journal**, v. 2, n. 6084, p. 422–4, 13 ago. 1977.

SAXENA, A. et al. Prevalence and outcome of subclinical rheumatic heart disease in India: the RHEUMATIC (Rheumatic Heart Echo Utilisation and Monitoring Actuarial Trends in Indian Children) study. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 97, n. 24, p. 2018–22, dez. 2011.

SCALZI, V. et al. Anti-endothelial cell antibodies in rheumatic heart disease. **Clinical and experimental immunology**, v. 161, n. 3, p. 570–5, set. 2010.

SCHAFRANSKI, M. D. et al. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. **Clinical and experimental immunology**, v. 138, n. 3, p. 521–5, dez. 2004.

SCHAFRANSKI, M. D. **POLIMORFISMOS DOS GENES MBL2 E MASP2 NA FEBRE REUMÁTICA**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2008.

SCHAFRANSKI, M. D. et al. Functional MASP2 gene polymorphism in patients with history of rheumatic fever. **Human immunology**, v. 69, n. 1, p. 41–4, jan. 2008a.

SCHAFRANSKI, M. D. et al. High-producing MBL2 genotypes increase the risk of acute and chronic carditis in patients with history of rheumatic fever. **Molecular immunology**, v. 45, n. 14, p. 3827–31, ago. 2008b.

SCHMALSTIEG, F. C.; GOLDMAN, A. S. Jules Bordet (1870-1961): a bridge between early and modern immunology. **Journal of medical biography**, v. 17, n. 4, p. 217–24, nov. 2009.

SEGAT, L. et al. MBL2 and MASP2 gene polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma. **Journal of viral hepatitis**, v. 15, n. 5, p. 387–91, maio 2008.

SHAH, B. et al. Rheumatic heart disease: progress and challenges in India. **Indian journal of pediatrics**, v. 80 Suppl 1, n. March, p. S77–86, mar. 2013.

SHULMAN, S. T. et al. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 55, n. 10, p. e86–102, 15 nov. 2012.

SKATTUM, L. et al. Complement deficiency states and associated infections. **Molecular immunology**, v. 48, n. 14, p. 1643–55, ago. 2011.

SØRENSEN, R.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. **Springer seminars in immunopathology**, v. 27, n. 3, p. 299–319, nov. 2005.

STÄGER, S. et al. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. **Nature medicine**, v. 9, n. 10, p. 1287–92, out. 2003.

STEER, A. C.; DALE, J. B.; CARAPETIS, J. R. Progress toward a global group a streptococcal vaccine. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 32, n. 2, p. 180–2, fev. 2013.

STENGAARD-PEDERSEN, K. et al. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 6, p. 554–60, 7 ago. 2003.

STOVER, C. et al. The human gene for mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2), the effector component of the lectin route of complement activation, is part of a tightly linked gene cluster on chromosome 1p36.2-3. **Genes and immunity**, v. 2, n. 3, p. 119–27, maio 2001.

STOVER, C. et al. Murine serine proteases MASP-1 and MASP-3, components of the lectin pathway activation complex of complement, are encoded by a single structural gene. **Genes Immun**, v. 4, n. 5, p. 374–84, 2003.

STOVER, C. M. et al. Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 6, p. 3481–90, 15 mar. 1999.

SWIERZKO, A. S. et al. Mannose-Binding Lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) in women with malignant and benign ovarian tumours. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, 20 jul. 2014.

TAKAHASHI, M. et al. A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. **International immunology**, v. 11, n. 5, p. 859–63, maio 1999.

TANDON, R. Rheumatic fever pathogenesis: Approach in research needs change. **Annals of pediatric cardiology**, v. 5, n. 2, p. 169–78, jul. 2012.

TANDON, R. et al. Revisiting the pathogenesis of rheumatic fever and carditis. **Nature reviews. Cardiology**, v. 10, n. 3, p. 171–7, mar. 2013.

THIEL, S. et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v. 386, p. 506–10, 1997.

THIEL, S. et al. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. **Genes and immunity**, v. 8, n. 2, p. 154–63, mar. 2007.

THIEL, S. et al. Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 5, p. 2939–47, 1 mar. 2009.

TIBAZARWA, K.; JA, V.; MAYOSI, B. Incidence of acute rheumatic fever in the world: a systematic review of population-based studies. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 94, n. 12, p. 1534–40, 2008.

TORRES, R. **Prevalência de estreptococos do grupo A e outros grupos sorológicos em crianças abaixo de sete anos de idade em creches na cidade de Curitiba, Brasil**. [s.l.] Universidade Estadual de Londrina, 2000.

TSAO, N. et al. Determining antibody-binding site of streptococcal pyrogenic exotoxin B to protect mice from group a streptococcus infection. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55028, jan. 2013.

TULIO, S. et al. MASP2 gene polymorphism is associated with susceptibility to hepatitis C virus infection. **Human immunology**, v. 72, n. 10, p. 912–915, 2011.

TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular immunology**, v. 40, n. 7, p. 423–9, 2003.

UNTERBERGER, C. et al. Stat3 is involved in control of MASP2 gene expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 364, n. 4, p. 1022–5, 28 dez. 2007.

VALLÈS, X. et al. Genetic and structural analysis of MBL2 and MASP2 polymorphisms in south-eastern African children. **Tissue antigens**, v. 74, n. 4, p. 298–307, out. 2009.

VASAN, R. et al. Echocardiographic evaluation of patients with acute rheumatic fever and rheumatic carditis. **Circulation**, v. 94, n. 1, p. 73–82, 1996.

VEASY, L. G. et al. Resurgence of acute rheumatic fever in the intermountain area of the United States. **The New England journal of medicine**, v. 316, n. 8, p. 421–7, 1987.

WEISS, G.; MADSEN, H. O.; GARRED, P. A novel mannose-binding lectin-associated serine protease 1/3 gene variant. **Scandinavian journal of immunology**, v. 65, n. 5, p. 430–4, maio 2007.

WOLFE, R. Incidence of acute rheumatic fever: a persistent dilemma. **Pediatrics**, v. 105, n. 6, p. 1375, 2000.

YONGQING, T. et al. Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? **Biochimica et biophysica acta**, v. 1824, n. 1, p. 253–62, jan. 2012.

YTTING, H. et al. Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and

physical exercise. **Scandinavian journal of immunology**, v. 66, n. 4, p. 458–64, out. 2007.

YTTING, H. et al. Mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 (MASP-2) genotypes in colorectal cancer. **Scandinavian journal of immunology**, v. 73, n. 2, p. 122–7, fev. 2011.

ZEHNDER, A. et al. Prognosis in Pediatric Hematologic Malignancies Is Associated With Serum Concentration of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease-2 (MASP-2). **Pediatric Blood Cancer**, v. 53, p. 53–57, 2009.

ZHANG, M. et al. MASP-2 activation is involved in ischemia-related necrotic myocardial injury in humans. **International journal of cardiology**, v. 166, n. 2, p. 499–504, 20 jun. 2013.

ZÜHLKE, L. J.; KARTHIKEYAN, G. Primary Prevention for Rheumatic Fever. **Global Heart**, v. 8, n. 3, p. 221–226, set. 2013.

ANEXO 1

Curitiba, 02 de dezembro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Sandra Jeremias dos Santos Catarino
Hospital de Clínicas da UFPR
Curitiba - PR

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado: “ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES DO SISTEMA COMPLEMENTO E A SUSCEPTIBILIDADE À FEBRE REUMÁTICA E CARDITE REUMÁTICA”, foi analisado com pendência pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 29 de novembro de 2011. Após, analisadas as respostas encaminhadas pela pesquisadora, este CEP considera o projeto aprovado em 02 de dezembro de 2011.

O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e suas complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0274.0.208.000-11
Registro CEP: 2658.265/2011-11

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: junho de 2012.

Atenciosamente,

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR